

Polysakkarider fra *Syzygium guineense* med effekt på immunsystemet

Struktur og aktivitets studier

Etnofarmakologiske studier i Mali



Mona Skogsrud

Hovedfagsoppgave for graden master i farmasi

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

2008

Polysakkarider fra *Syzygium guineense* med effekt på immunsystemet

Struktur og aktivitets studier

Etnofarmakologiske studier i Mali

av

Mona Skogsrud

Oslo, 11 mai 2008

Hovedfagsoppgave for graden master i farmasi

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Universitetet i Oslo

FORORD

Takk rettes til

Professor Berit Smestad Paulsen for dyktig veiledning og godt samarbeid med utførelsen av hovedfaget. Gjennom engasjert veiledning har du bidratt til et utfordrende og lærerikt hovedfag. Takk for all oppmuntring og god støtte.

Dr. Drissa Diallo for et uforglemmelig opphold i Mali. Du gjorde en god jobb som intervjuer og oversetter under feltarbeidet i Siby. Takk for ditt engasjement og evne til å inspirere.

Dr. Sekou Bah og N`golo Balo for deres fantastiske innsats på feltarbeid i Diolia. Takk for en uforglemmelig ferie i Mali. Takk for deres væremåte og positive respons.

Tom Erik Grønhaug for sitt engasjement, all hjelp og for mange praktiske råd på laboratoriet. Takk for hyggelig selskap i Mali.

Reisefølge mitt i Mali, Silje Glæserud for hyggelig selskap.

Torunn Aslaksen for mye hjelp gjennom året

Finn Tønnesen for gjennomførelse av GC/MS og god veiledning ved IR-analysen ved avdeling for legemiddelanalyse.

Terje Michaelsen for tilrettelegging av komplementfikseringstesten ved Statens Institutt for Folkehelse

Marit Inngjerdingen og Parakashtha Ghildyal for gjennomførelse av test på makrofagaktivering.

Alle ansatte og hovedfagsstudenter for godt selskap og stor hjelpsomhet.

En stor takk til mamma og pappa for støtte, oppmuntring og tilstedeværelse under hele studiet.

Takk til gode venner for støtte, oppmuntring og god tålmodighet under hele studiet.

Oslo, 5. mai 2008

Mona Skogsrud

Innholdsfortegnelse

1. SAMMENDRAG	7
2. FORKORTELSER	9
3. HENSIKT FOR OPPGAVEN	11
3.1 BAKGRUNN FOR OPPGAVEN	11
3.2 MÅL MED OPPGAVEN	12
4. BAKGRUNN	13
4.1 SYZYGIUM GUINEENSE (WILLD) DC.....	13
4.1.1 Taksonomisk klassifisering.....	14
4.1.2 Nomenklatur	14
4.1.3 Botanikk og Habitat	14
4.1.4 Tradisjonell bruk	15
4.1.5 Tidligere funn	15
4.2 PLANTECELLEVEGGEN.....	16
4.2.1 Oppbygging og funksjon.....	16
4.2.2 Midtlammelen.....	16
4.2.3 Primærcellevegg.....	16
4.2.4 Sekundær cellevegg.....	17
4.2.5 Plantecelleveggenes varierte funksjoner	17
4.3 KARBOHYDRAT	18
4.3.1 Karbohydrater: Inndeling, klassifisering og kjemisk struktur.....	18
4.3.2 Pektiner i plantecelleveggen.....	20
4.4 IMMUNOLOGISK AKTIVE PEKTIN POLYSAKKARIDER.....	24
4.4.1 Immunsystemet	24
4.4.2 Makrofag	24
4.4.3 Komplementsystemet	25
4.4.4 Regulert komplementsystem	27
4.4.5 Anti-komplementære pektinpolysakkarider: Struktur og aktivitet.....	28
5. ETNOFARMAKOLOGISK BASERTE SØK I MALI.....	29
5.1 INNLEDNING	29
5.2 ETNOFARMAKOLOGISK BASERTE SØK- EN KILDE TIL NYE LEGEMIDLER OG NY KUNNSKAP	30
5.3 MALI	31
5.4 TRADISJONELL MEDISIN I MALI / ” DEPARTMENT OF TRADITIONAL MEDICINE” (DMT).....	32
5.5 TIDLIGERE FUNN	33
5.6 FELTARBEID	34
5.7 RESULTATER OG DISKUSJON	36

5.8	DISKUSJON AV RESULTATENE	47
5.9	KVALITATIV UNDERSØKELSE AV RESULTATENE FRA FELTARBEID UTFØRT DESEMBER 2007.....	48
5.10	SAMMENLIKINGSSTUDIE FRA FELTARBEID UTFØRT 2006-2007	50
6.	EKSPERIMENTELT	51
6.1	GENERELLE EKSPERIMENTELLE METODER	51
6.1.1	<i>Metoder basert på Absorbansmåling</i>	<i>51</i>
6.1.2	<i>Blanding av løsninger</i>	<i>51</i>
6.1.3	<i>Evakuering av luft i fra løsninger.....</i>	<i>51</i>
6.1.4	<i>Filtrering</i>	<i>51</i>
6.1.5	<i>Frysetørring</i>	<i>51</i>
6.1.6	<i>Innveiting.....</i>	<i>52</i>
6.1.7	<i>Sentrifugering.....</i>	<i>52</i>
6.1.8	<i>Syrevask av glassutstyr.....</i>	<i>52</i>
6.1.9	<i>Volumreduksjon.....</i>	<i>52</i>
6.2	METODEPRINSIPPER.....	53
6.2.1	<i>Isolering og oppresning av polysakkaridfraksjoner.....</i>	<i>53</i>
6.2.2	<i>Kvantitative og kvalitative bestemmelser av polysakkaridfraksjoner.....</i>	<i>58</i>
6.2.3	<i>Metoder for strukturanalyser av polysakkaridfraksjoner.....</i>	<i>61</i>
6.2.4	<i>Metoder for måling av biologisk aktivitet</i>	<i>67</i>
6.3	EKSPERIMENTELL UTFØRELSE	69
6.3.1	<i>Ekstraksjon av plantematerialet.....</i>	<i>69</i>
6.3.2	<i>Kolonnekromatografisk separasjon av planteekstrakter.....</i>	<i>70</i>
6.3.3	<i>Desalting av planteekstrakter.....</i>	<i>74</i>
6.3.4	<i>Kvantitative og kvalitative bestemmelser av polysakkaridfraksjoner.....</i>	<i>75</i>
6.3.5	<i>Strukturanalyser av polysakkaridfraksjoner</i>	<i>78</i>
6.3.6	<i>Måling av biologisk aktivitet.....</i>	<i>86</i>
7.	RESULTATER OG DISKUSJON	90
7.1	ISOLERING OG OPPRENSNING AV POLYSAKKARIDFRAKSJONER	91
7.1.1	<i>Ekstraksjon av plantematerialet.....</i>	<i>91</i>
7.1.2	<i>Kolonnekromatografisk separasjon av fraksjon H på ionebytterkolonne med DEAE-Sephrose som gelmatriks.....</i>	<i>92</i>
7.1.3	<i>Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av monosakkarider i HSUR 1 og HSUR 2 ved Metanolyse, TMS derivatisering og Gasskromatografi</i>	<i>94</i>
7.1.4	<i>Molekylvekt betemt fraksjonering av HSUR1 med Sephacryl-S400 som gelmatriks.....</i>	<i>96</i>
7.1.5	<i>Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av monosakkarider i HSUR 1A og HSUR1B</i>	<i>97</i>
7.2	STRUKTURANALYSER	99
7.2.1	<i>Strukturbestemmelse av fraksjon HSUR1A OG HSUR1B ved Yariv metode</i>	<i>99</i>
7.2.2	<i>Proteinbestemmelse av HSUR 1 A og HSUR 1B ved Lowry metode.....</i>	<i>100</i>
7.2.3	<i>Aminosyreanalyse på fraksjon HSUR1B.....</i>	<i>102</i>

7.2.4	<i>Bindingsforhold i fraksjon HSUR1A og HSUR1B.....</i>	<i>103</i>
7.2.5	<i>Svak syrehydrolyse: Bestemmelse av Araf i fraksjon HSUR1B.....</i>	<i>107</i>
7.2.6	<i>Påvisning av native estergrupper ved IR- spektroskopi i HSUR1A og HSUR 1B.....</i>	<i>108</i>
7.2.7	<i>Molekylvekt-fordeling i HSUR1A og HSUR1B: Separasjon på HiLoad 26/60 Superdex 200 kolonne.....</i>	<i>108</i>
7.3	MÅLING AV BIOLOGISK AKTIVITET AV HSUR1A OG HSUR1B	110
7.3.1	<i>Komplementfikseringstesten.....</i>	<i>110</i>
7.3.2	<i>Makrofagstimulering.....</i>	<i>112</i>
8.	KONKLUSJON	114
8.1	ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER I MALI	114
8.2	PRØVEOPPARBEIDELSE: ISOLERING OG OPPRENSNING AV POLYSAKKARIDFRAKSJONER	114
8.3	STRUKTURSTUDIER.....	114
8.4	IMMUNOLOGISK AKTIVITET	115
8.5	FORSLAG TIL VIDERE ARBEID.....	115
9.	VEDLEGG	117
10.	REFERANSER	120

1. Sammendrag

En etnofarmakologisk studie ble utført i Mali, desember 2007. Det ble spurt om 8 forskjellige medisinsplanter, men kun resultatene fra *S. guineense* har blitt omtalt i denne oppgaven. Feltarbeid ble utført i Kati, Bamako, Siby og Dioila. Til sammen 30 healere ble intervjuet, og 25 healere brukte *S. guineense* i sin praksis. Resultatene ble sammenliknet med resultat fra tidligere feltarbeid utført i januar/februar 2006 og mars/april 2007. Det er ingen spesiell indikasjon som utmerker seg mer enn andre, men flere av de nevnte indikasjonene er typiske indikasjoner der en i moderne medisin bruker legemidler med effekt på immunforsvaret. Basert på den etnofarmakologiske studien og tidligere utført arbeid på *S. guineense* blader har videre studier på struktur og aktivitet blitt utført i denne oppgaven, og resultatene er sammenliknet med funn fra tidligere utført arbeid.

Finpulverisert bladmaterialet fra *S. guineense* ble ekstrahert suksessivt med diklormetan, metanol og vann, 50°C. Vanneksraktet ble videre isolert og opprenset på en Bio-Gel® P6-DG kolonne, DEAE-Sephacrose Fast Flow ionebytterkolonne og en Sephacryl-S400 gelfiltreringskolonne. Dette gav 2 sure høymolekylære fraksjoner, HSUR1A og HSUR1B.

Karbohydratsammensetning av fraksjonene ble bestemt ved metanolyse, TMS derivatisering og gasskromatografi. HSUR1A og HSUR1B inneholdt mye Ara og Gal, samt moderate mengder av GalA og Rha. Yariv test viste innhold av AGII strukturer i HSUR1B, men kun spor av AGII ble vist i HSUR1A. Proteinbestemmelse ved Lowry modifiserte metode viste til proteininnhold i HSUR1B, men kun spor av protein i HSUR1A. Det er stor sannsynlighet for at HSUR1B inneholder AGP, aminosyreanalyse detekterer aminosyrer som er typisk for kjerneprotein i AGP.

Bindingsforhold ble bestemt med karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon og GC/MS. Begge fraksjoner viser til en kompleks struktur med mange forgreninger. Fraksjonene viser til pektiner med en hovedkjede bestående av alternerende enheter av galakturonsyre og rhamnose med sidekjeder av arabinaner og arabinogalaktaner, rhamnogalakturonan type I (RG-I). Sur syrehydrolyse viser til at Ara foreligger i høy grad på furanoseform. Begge fraksjoner viser til AG-II struktur, men HSUR1A viser i tillegg til spor av AG-I strukturer.

Molekylvektsområdet til hver fraksjon ble bestemt ved separasjon på en HiLoad 26/60 Superdex 200 kolonne. HSUR1A og HSUR1B har svært forskjellig molekylvektfordeling. HSUR1A er trolig en heterogen blanding av mange molekylvekter som strekker seg over et intervall, 5,66-66.6 kDa, mens HSUR1B har et snevert molekylvektsområde, 1,69-2,85 kDa.

HSUR1A og HSUR1B ble testet med hensyn på komplementfikserende evne. HSUR1A og HSUR1B viser til tilsvarende aktivitet som PM-II standard. HSUR1A var noe mer aktiv enn HSUR1B. Griess

reaksjon ble utført på HSUR1A og HSUR1B for å måle NO frigjøring fra makrofag, begge fraksjoner viste evne til å stimulere vevsmakrofag.

2. Forkortelser

α	OH gruppen på anomere karbonatom, C1, er i aksial posisjon (Under ringplanet)
AG	Arabinogalaktan
AG I	Arabinogalaktan type 1
AG II	Arabinogalaktan type 2
AGP	Arabinogalaktanprotein
Ara	Arabinose
Araf	Arabinose på furanoseform
β	OH gruppen på anomere karbonatom, C1, er i ekvatorialt posisjon (Over ringplanet)
C	Karbonatom
Ca ⁺	Monovalent kalsium ion
Ca ²⁺	Divalent kalsium ion
Cl ⁻	Klor ion
COOH	Karboksylsyre
D	Dextrorotarisk
DEAE	Dietylaminoetyl
DCM	Diklormetan
f	furanoseform
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
GC/MS	Gasskromatografi / massespektroskopi
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
H	Hydrogenatom
H	Fraksjon H etter isolering på Bio-Gel [®] P6-DG kolonne.
HSUR1	SUR fraksjon 1 etter isolering på DEAE- Sepharose Fast Flow ionebytterkolonne
HSUR 2	SUR fraksjon 2 etter isolering på DEAE- Sepharose Fast Flow ionebytterkolonne
HSUR1A	Fraksjon med lavest Mw etter separasjon på Sephacryl S-400-gelfiltreringskolonne
HSUR1B	Fraksjon med høyest Mw etter separasjon på Sephacryl S-400-gelfiltreringskolonne
HR	High Resolution
HG	Homogalakturonan
Hyp	Hydroxyprolin
IC50	Konsentrasjon som gir 50 % hemolyse
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IR	Infrarød
kBr	Kaliumbromid

kDA	Kilodalton
L	Levorotarisk
LPS	Lipopolysakkarid
M	Masse
MAC	Membran atakk kompleks
Man	Mannose
MeGalA	Metylesterfisert galakturonsyre
MeOH	Metanol
Mw	Molekylvekt
MWCO	Molecular Weight Cut Off
N ₂	Nitrogengass
NO	Nitrogenoksid
NO ²⁻	Nitritt
O	Oksygenatom
PM II	Plantago Major fraksjon II
Xyl	Xylose
RG I	Rhamnogalakturonan type 1
RG II	Rhamnogalakturonan type 2
Rha	Rhamnose
SN1	Nukleofil substitusjonsreaksjon type 1
SN2	Nukleofil substitusjonsreaksjon type 2
T	Terminal

3. Hensikt for oppgaven

3.1 Bakgrunn for oppgaven

Polysakkarider isolert i fra medisplanter har vist å påvirke flere deler av immunsystemet. Ved Farmasøytisk institutt, avdeling for Farmakognosi har det gjennom mange år blitt forsket på polysakkarider fra immunomodulerende planter fra Mali. Forskningsgruppen har konsentrert sitt arbeid på polysakkarider med effekt på det medfødte immunforsvar. Plantene som selekteres ut har i tradisjonell medisin i Mali blitt brukt som sårhelene middel, til bekjempelse av infeksjoner eller til andre sykdom relatert til immunsystemet. Informasjon om de planter som selekteres innhentes ved intervju med tradisjonelle healere i Mali, dette i samarbeid med Department of Traditional Medicine, Bamako, Mali.

Polysakkarider er en kompleks gruppe biopolymere, og forskningen tar sikte på å finne de beste og mest effektive isoleringsprinsipper av de aktuelle høymolekylære substanser og strukturstudier av disse. Målet er å finne de eksakte strukturelle trekk som kan brukes i kommersiell sammenheng, som et supplement til antibiotika, forebygging av infeksjoner og til økt beskyttelse mot potensielt farlige mikroorganismer. Som mål på immunomodulerende aktivitet bestemmes polysakkaridenes evne til å påvirke komplementsystemet og deres evne til å stimulere vevsmakrofag.

Denne oppgaven baserer seg på videre studier av den Maliske medisplanter *Syzygium guineense*. I 2006 ble arbeid på denne planten utført og resultatene viste både til komplementfikserende aktivitet og til makrofagstimulering, dette spesielt for pektinpolysakkarider i et 50°C vannekstrakt av blader fra *S. guineense*. Strukturstudier viste at vannekstraktet kan inneholde pektiner med en hovedkjede bestående av alternerende enheter av galakturonsyre og rhamnose med sidekjeder av arabinogalaktaner. Det antas at vannekstraktet inneholder pektiner av type Rhamnogalakturonan I og Arabinogalaktan II, dette er de strukturelle trekk i pektinmolekylet som menes å være ansvarlig for den biologiske aktiviteten.[1] Basert på grunnforskning, folkemedisin og lokalkunnskap vil det i denne masteroppgaven studeres for om et 50°C vannekstrakt fra *Syzygium guineense* kan ha kommersiell verdi som antatt fra tidligere arbeid.

3.2 Mål med oppgaven

Oppgaven har 2 overordende mål:

1. Etnofarmakologiske studier i Mali. Dette innebærer feltarbeid med healerintervju i ulike områder i Mali med den hensikt å undersøke bruk av blader fra *S. guineense* i tradisjonell medisin. Resultatene vil brukes til å sammenlikne med funn fra tidligere utført feltarbeid i Mali. Oppgaven tar primært sikte på *S. guineense* sin anvendelse mot indikasjoner relatert til immunsystemet, da resultat fra tidligere arbeid har antydnet dette. Studien vil utføres i tett samarbeid med Department of Traditional Medicine i Mali, og studien følger de etiske prinsipper og de 3 hovedmål fastsatt av konvensjonen for biologisk mangfold: Bevaring av biologisk mangfold, bærekraftig bruk av biologiske ressurser og rettferdig fordeling av genetiske ressurser.
2. Polysakkarider fra et 50°C vannekstrakt fra bladene til *S. guineense* skal isoleres og karakteriseres med hensyn på monosakkaridsammensetning og bindingsforhold. Resultatene skal brukes til å sammenlikne med resultat fra tidligere utført arbeid. Videre skal nye strukturstudier utføres med det mål å finne de strukturelle trekk som kan være ansvarlig for den antydede immunologiske aktiviteten. Som mål for immunlogisk aktivitet vil polysakkaridene undersøkes for aktivitet på komplementsystemet og evne til å stimulere vevsmakrofag.

4. Bakgrunn

4.1 *Syzygium guineense* (Willd) DC



Figur 1: *S. guineense* og forfatteren i Sibi, Mali 2007.



Figur 2: *S. guineense* vokser ved en elv i Zimbabwe.[2]



Figur 3: Blomster og blader på *S. guineense*. [2]

Syzygium er derivert i fra det greske ordet ”Syzygios” som betyr paret, navnet er gitt fordi blader og kvister ofte vokser i samme retning. Artsnavnet *guineense* kommer i fra Guinea, landet der treet ble først oppdaget. [3]

Treet *Syzygium guineense* tilhører familien *Myrtaceae*, og er vanlig i de tropiske områder i Afrika. Fullstendig taksonomisk klassifisering med synonymer og lokale navn, samt en beskrivelse av botanikk og habitat er gitt under punktene 4.1.1-4.1.3, deretter følger en kort oversikt over tidligere funn og tradisjonell bruk av *S. guineense*.

4.1.1 Taksonomisk klassifisering

Rike:	Plantae (planterike)
Underrike:	Tracheobionta (karplanter)
Divisjon:	Magnoliophyta (blomsterplanter, dekkfrøet)
Klasse:	Magnoliopsida (tofrøbladet)
Underklasse:	Rosidae
Orden:	Myrtales
Familie:	Myrtaceae
Slekt:	<i>Syzygium</i>
Art:	<i>guineense</i> [4]

4.1.2 Nomenklatur

Synonymer. [3]	Lokale navn [3,5]
<i>Syzygium owariense</i> (P. Beauv) Benth. <i>Syzygium legatii</i> Burt Davy & Greenway <i>Syzygium gerrardii</i> (Harvey ex J. D. Hook.) Burt Davy <i>Syzygium fleuryi</i> A. Chev. <i>Eugenia owariensis</i> P. Beauv. <i>Calypttranthes guineensis</i> Willd <i>Eugenia guineensis</i> Willd.	Engelsk: Snake bean tree, waterberry, waterboom, waterpear, woodland waterberry. Fransk: Kisa d'eau (Bailleul) Mali: Dogon: Alukile, Manding-Maninka: kissa, ko kissa Senegal: Guiena: Basari a-nyin, Fula-Puular Swahili: Msambaran, mzambarai, mzambarani, mzambarau, mwitu, mzuari

4.1.3 Botanikk og Habitat

S. guineense er et 15-30 meter høyt tre med en tykk og angulær stamme. Treet vokser i regnskoger, i svampområder, ved elver og vassdrag. Av og til vokser det også i vann. Ofte kan en se treet vokse på steingrunn i savannene, men kun der treet har tilgang til lys og fuktighet. I Mali hvor plantematerialet ble samlet inn vokser treet sør for Sahara-ørkenen, nær de to store elvene Senegal og Niger, og ved andre vassdrag og i sumpområder.

Bladene til *S. guineense* er smale i begge ender med lengde 5-17,5 cm og bredde 1,3-7,5 cm. Bladene gir en velluktende duft når de knuses. Barken endrer seg når treet eldres, unge tre har en gråhvit til sølvspettet glatt bark, mens de eldre tre har en lett grå, mørkbrun eller svart skjellet og ru bark. Hvis barken kuttes vil en rød saft renne ut. Frukten er enfrøet, frøene er runde og gulbrune. Umoden frukt

er hvitgrønn, moden frukt er saftig og har en lillasvart farge. Blomstene er kremhvite og velluktene.
[3]

4.1.4 Tradisjonell bruk

I Folkemedisin er *Syzygium guineense* en nyttig plante i det tropiske Vest-Afrika. I tabell 1 følger en oversikt over tradisjonell anvendelse av *S. guineense* i noen land i Afrika. Hyppig nevnte indikasjoner er relatert til gastrointestinaltraktus (Diaré obstipasjon og magesmerter), men også sykdom assosiert med immunforsvaret (Sårheling og Revmatisme)

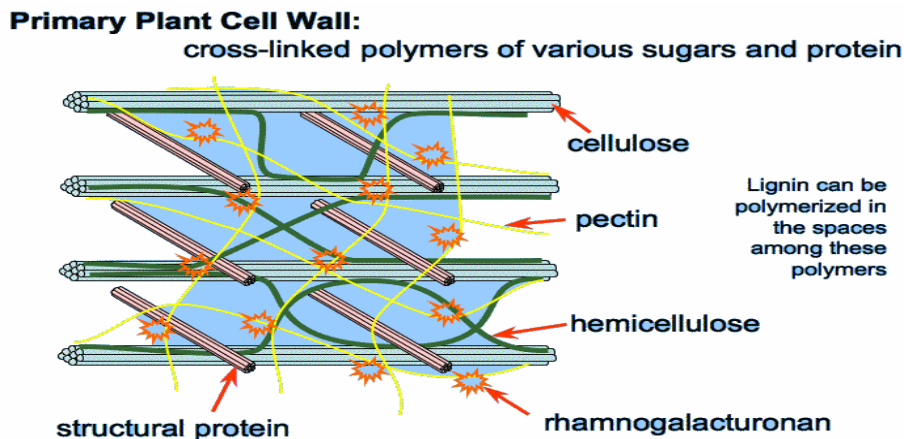
Tabell 1: Tradisjonell bruk av *Syzygium guineense*

Land	Tradisjonell anvendelse: Indikasjon, preparasjon og dosering
Senegal	Dekokt av barken brukes som laksativa og dekokt av en blanding av blader anbefales mot magesmerter under graviditet.[5]
Sierra Leone	Knuste blader brukes til sårheling.[5]
Elfenbenskysten	<i>S.guineense</i> er mye brukt, men ansees som mindre verdifull. Brukes mot sterilitet, abort, gulfeber, og koma. Hvilke plantedel som benyttes er ikke gitt. Dekokt av blader brukes mot magesmerter og ved forstuing. Ved hjertebank brukes pulveriserte unge blader blandet med frø fra <i>Aframomum melegueta</i> . [5]
Tanzania	Dekokt av bark og rot brukes mot revmatisme og ekstrakt brukes mot diaré. [5]
Uganda	Barken blir brukt til å behandle magesmerter.[6]
Swaziland	Mot diarè. Dekokt av bark drikkes 3 ganger daglig, 1 ts for barn og 1 ss for voksen.[7]

4.1.5 Tidligere funn

S. guineense er tidligere lite undersøkt for kjemiske forbindelser og bioaktivitet. I en studie ble triterpener isolert fra blader undersøkt for antibakteriell aktivitet mot *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* og *Shigella sonnei*. Av de isolerte triterpener ble det vist at Asiatsyre (asiatic acid) og terminolsyre (terminolic acid) hadde signifikant antibakteriell aktivitet.[8]

4.2 Plantecelleveggen



Figur 4: Primærcelleveggen [10]

4.2.1 Oppbygging og funksjon

Planteceller skiller seg fra de eukaryote celler ved å ha en cellevegg. Plantecelleveggen er et tykt ekstracellulært matriks som ligger utenfor cellemembranen, og omgir hver celle i planten. Plantens cellevegg er delt i 3 lag: midtlamellen, primær cellevegg og sekundær cellevegg. Plantecelleveggen er hovedsaklige bygget opp av polysakkarider (cellulose, hemicellulose og pektin), protein og lignin. [9]

4.2.2 Midtflammelen

Midtflammelen er et spesialisert område som ligger like over celleveggen, den er rik på pektin som er assosiert med kalsium, kalsiumpektat. Det er via midtflammelen naboceller kommer i kontakt og kommuniserer med hverandre. Kalsium er helt essensielt for denne kontakten. [9]

4.2.3 Primærcellevegg

Celler som vokser omsluttet av en polysakkarid-rik primærcellevegg. Primærcelleveggen er tynn og plastisk. Den kan tøyes og strekkes slik at cella blir større, men kan ikke finne tilbake til sin opprinnelige form. Primærcelleveggen består av cellulose, hemicellulose, pektin og protein. I primærcelleveggen vil omtrent 40 cellulosekjeder binder seg til hverandre i en bunt, der alle er av samme polaritet. Disse aggregatene krystalliseres til cellulose mikrofibriler. De har en tensilstyrke som kan sammenlinkes med stål. Flere sett av mikrofibriler arrangeres i lag som kalles lameller, der hemicellulose binder seg til overflaten til hver mikrofibril for å kryssbinde mikrofibrilene i et komplekst og robust nettverk. Innad i nettverket av cellulose mikrofibriler og hemicellulose finnes i tillegg et annet nettverk av kryssbindende polysakkarider basert på pektiner. (Figur 4) [9]

4.2.4 Sekundær cellevegg

Når cellen slutter å vokse kan nytt materiale produseres mellom primærceleveggen og plasmamembranen. Sist nevnt er plantens sekundærcelevegg. Celleveggen mister på dette stadiet sin plastisitet, og undergår modifikasjoner for å gi plantecellene ytterligere rigiditet og styrke. Lignin er et komplekst nettverk av fenolske forbindelser som produseres i sekundærceleveggen. Lignin avsettes mellom andre komponenter i celleveggen, slik at celleveggen blir permanent og rigid. [9]

4.2.5 Plantecelleveggenes varierte funksjoner

- Gi cellene rigiditet og styrke.
- Spille en viktig rolle i cellas beskyttelse mot patogene mikroorganismer
- Hjelper til med å lage kanaler slik at væske, næringsstoffer og elektrolytter kan kontrollert strømme inn i cellene. Beskytter mot dehydrering og opprettholder en osmotisk ballanse.
- Strukturell og mekanisk støtte til plantecellene. Omtales som plantecellenes skjelett.
- Lager for polysakkarider
- Celler til celleinteraksjon

4.3 Karbohydrat

4.3.1 Karbohydrater: Inndeling, klassifisering og kjemisk struktur

De første sukkerforbindelsene som ble studert inneholdt kun grunnstoffene karbon (C), oksygen (O) og hydrogen (H), med et H:O forhold identisk med vann, på bakgrunn av denne observasjonen fikk sukkerartene navn karbohydrat eller hydrater av karbon med den generelle formelen $C_x(H_2O)_y$. I ettertid er det vist at karbohydratene er en svært kompleks gruppe polymere med et mangfold av kjemiske forbindelser som strekker seg over et stort molekylstørrelse område. [11]

Karbohydratene ble omdefinert til polyhydroksy aldehyder eller ketoner, eller forbindelser som er derivert i fra disse: sukkeralkoholer, sukkersyrer, aminosukker etc. Karbohydrat der sukkersyrer er innlemmet i molekylet er negativt ladet og følgelig surt. Karbohydrat uten sukkersyrer er fri for ladning og følgelig nøytrale. [11]

Karbohydratene deles inndeles i 3 grupper: De lavmolekylære mono og disakkarider, de intermediærmolekylære oligosakkarider og de høymolekylære polysakkarider. [11]

De lavmolekylære monosakkarider og disakkarider, og de intermediær molekulære oligosakkarider

Monosakkarider er polyhydroksy aldehyder eller ketoner. De består av 3-9 C- atomer og inndeles i aldoser eller ketoser avhengig om de den funksjonelle gruppen er et aldehyd eller et keton..

Monosakkarider eksisterer ofte som sykliske hemiacetaler. En ringstruktur som er femkantet er en furanosering, mens en ringstruktur som er sekskantet er en pyranosering. Ringstrukturen gir forskjellige konfigurasjoner, α eller β konfigurasjon. Pyranosering gir ulik romlig utforming (konformasjon), stol eller båtform. En konformasjon som er lavest i energi vil alltid være favorisert. I løsningsinnstillingen er det en likevekt mellom konformasjonene, der det er størst mengde av den favoriserte konformasjonen.. Et disakkarid består av 2 monosakkarider bundet til hverandre med en glykosidbinding. Glykosidbinding vil "fryse" den anomere forma i α eller β konfigurasjon. Oligosakkarider er sukker bestående av 3-9 monosakkarider. [11,13]

De høymolekylære polysakkarider

De høymolekylære polysakkarider er en sammensatt og kompleks gruppe polymere der minst 10 monosakkarider er bundet til hverandre med glykosidbindinger. Glykosidbindingene kan enten ha α eller β konfigurasjon og monosakkaridene kan binde seg til hverandre i varierte posisjoner, eksempelvis $1 \rightarrow 4$ og $1 \rightarrow 3$. Polysakkarider har en svært høy molekylvekt, størrelsen på et polysakkarid varierer fra noen tusen til flere millioner dalton. Polysakkarider kan være lineære eller forgreinede. De som er sammensatt av en type monosakkarid kalles homopolysakkarid, mens polysakkarider sammensatt av to eller flere typer monosakkarider kalles for heteropolysakkarid. For de heterogene polysakkaridene er monosakkaridenhetene sjeldent bundet tilfeldig til hverandre, men i mer definerte mønstre, som kjeder med repeterende enheter. [11,13]

Hydroksylgruppene og andre polare funksjonelle grupper bestemmer polysakkaridenes vannløselighet og ekstraherbarhet med vann. Løselighet øker med temperaturen, temperatur blir dermed en viktig parameter når spesifikke polysakkaridstrukturer skal ekstraheres fra plantecelleveggen. Polysakkarider av interesse kan separeres fra de andre plantekomponenter med kolonne kromatografiske metoder.[12]

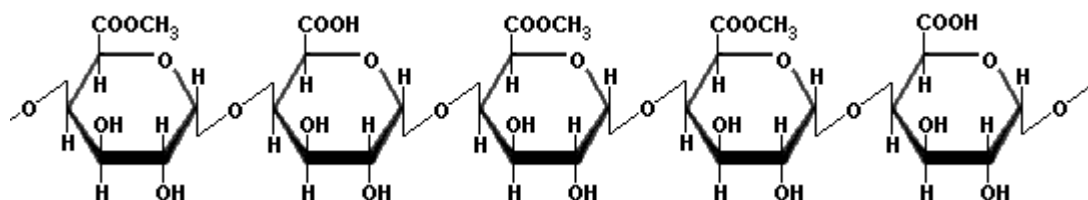
Polysakkarider er multifunksjonelle. De er viktige strukturelle komponenter, de forsterker, støtter opp og stabiliserer en struktur. Videre er de en viktig energikilde, de kan danne gel og viskøse løsninger. På grunn av de egenskapene polysakkaridene har som biopolymere vil de i den kommersielle sektor ha et industrielt potensial. Polysakkaridene har utallige anvendelsesområder innen teknologi og forskning og benyttes også i en rekke matvarer og farmasøytiske produkter. [11,13]

4.3.2 Pektiner i plantecelleveggen

Pektiner er polymolekylære, polydisperse og multifunksjonelle forbindelser, som er vanligst forekommende i midtlamellen og primærcelelveggen. I midtlamellen er pektin uløselig og foreligger som kalsiumpektat. Pektiner kan isoleres fra plantematerialet ved ekstraksjon med varmt vann, fortynnet syre eller en løsning med chelaterende forbindelser (EDTA). Sistnevnt kan brukes der pektiner er sterkt assosiert med Ca^{2+} , da EDTA kan abstrahere Ca^{2+} fra pektinmolekylet og spalte ionebindinger. Vann vil spalte hydrogenbindinger og van der Waals interaksjoner. Da vannløselighet øker med temperaturen vil polysakkaridenes ekstraherbarhet tilsvarende øke med temperaturen.[11,14]

Pektin består av minst tre spesifikke strukturelle domener: Homogalakturenan(HG), Rhamnogalakturenan I(RG-I) og Rhamnogalakturenan II(RG-II). En teori er at disse tre pektinpolysakkaridene er kovalent bundet til hverandre og danner et pektin makromolekyl, men ekstakt hvordan de 3 strukturelle domene er organisert i molekylet er uvisst. Det kan se ut at både RG-I og RG-II er bundet til HG, men om RG-I og RG-II binder seg til samme kjede er ukjent. RG-I og RG-II er strukturelt sett svært ulike, noe som gjør at de omtales som de to hovedgruppene pektin polysakkarider.[14,15]

Homogalakturenan

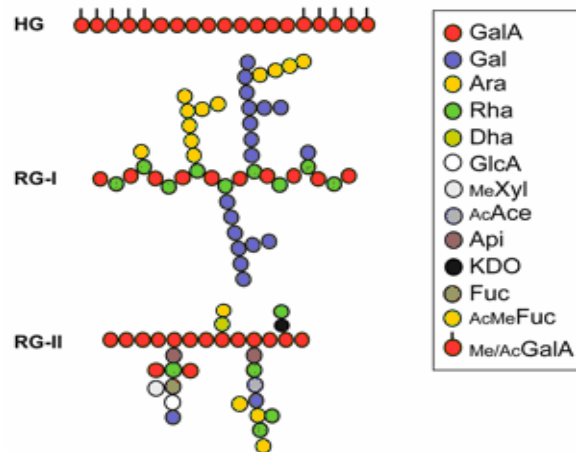


Figur 5: Homogalakturenan: α-(1, 4) D-galakturonsyre med varierende grad metylestergrupper [16]

Pektiner kjennetegnes med to områder, de såkalte glatte og hårete områder. Pektinpolysakkaridenes ”glatte område” består av en lange lineære kjeder av α-(1→4) bundet D-galakturonsyre i pyranoseform. Denne delen av pektinmolekylet kalles homogalakturenan.(Figur 4 og 5)

Karboksylsyrene er i varierende grad metylesterfiserte og hydroksylgruppene på C2 og C3 kan være acetyllert. Innføring av metyl og acetylgrupper øker pektinpolysakkaridenes hydrofobisitet, og er med på å gi i variasjon i de kjemiske og fysiologiske egenskapene til pektinpolysakkaridene. Fri galakturonsyre gir pektin negativ ladning og sur karakter. Negativ ladning trekker til seg mye vann og kationer. Karboksylsyregrupper i pektinmolekylene kan danne kryssbindinger med Ca^{2+} og danne gel, følgelig er pektiner velegnet til å hefte celler sammen.[15,16]

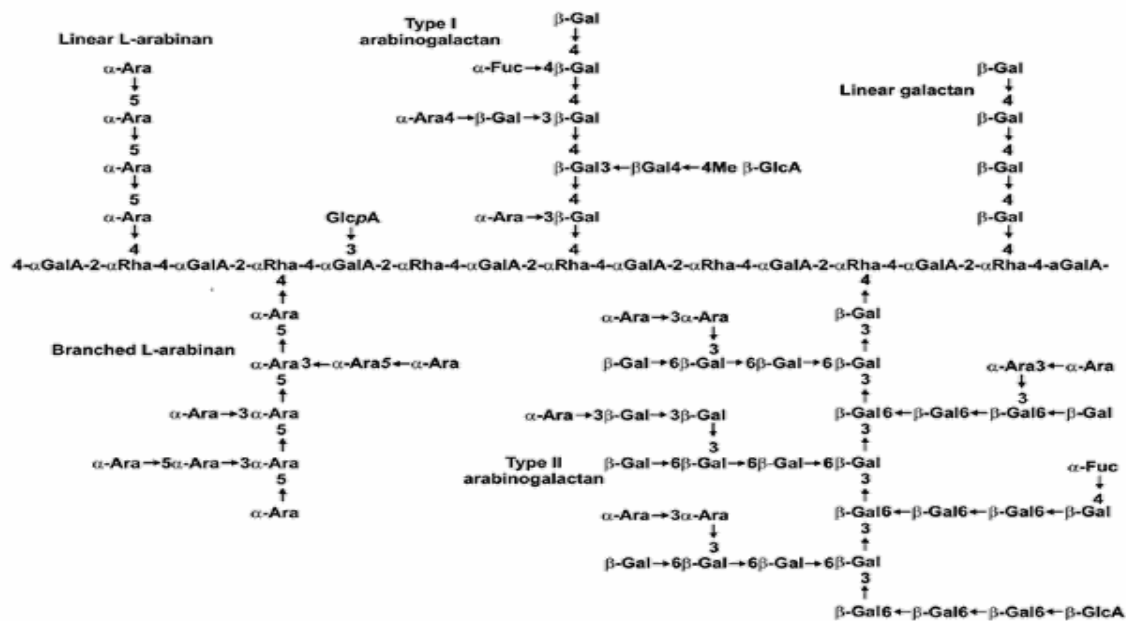
Rhamnogalakturonan



Figur 6: Viser til hvilke monosakkarider pektinmolekylets tre spesifikke strukturelle domener er sammensatt av.[17]

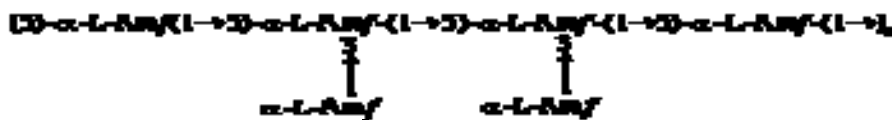
Den lange kjeden av homogalakturonan kan avbrytes med områder rik på rhamnose. En hovedkjede bestående av alterende enheter av α -(1 \rightarrow 4)-D-GalA og α -(1 \rightarrow 2)-L-Rha med sidekjedene av nøytrale sukker arabinaner, galaktaner og arabinogalaktaner kjennetegnes som Rhamnogalakturonan I.(Figur 6,7). Sidekjedene bindes til rhamnose primært i posisjon C4, men C3 forekommer også. Dette område omtales som pektin polysakkaridenes ”hårete område”. Rhamnogalakturonan har derfor en mye mer heterogen struktur enn homogalakturonan.[15,16]

RG II består av en hovedkjede av 7-9 GalA enheter, der posisjon C3 og C4 på GalA er substituert med fem forskjellige oligosakkarider. Det mest karakteristiske med RG II er svært sjeldene oligosakkarider som 2-O-metylfucose, 2-O-metylxylose og apiose. Strukturen er svært komplekst, kanskje det mest komplekse plante-polysakkaridet på jorda. RG-II beskrives som et lavmolekylært ”mega-oligosakkarid”. Antistoff baserte studier har vist at RG II forekommer sjeldent i midtlamellen, men forekommer hyppig i primærcellevegg. Totalt utgjør RGII mindre enn 5 % av den samlede mengden pektin.[19]



Figur 7: Skjematisk fremstilling av primærstrukturen av RG-1, viser til sidekjeder av AG-I og AG-II, arabinaner og galaktaner.[18]

Arabinaner



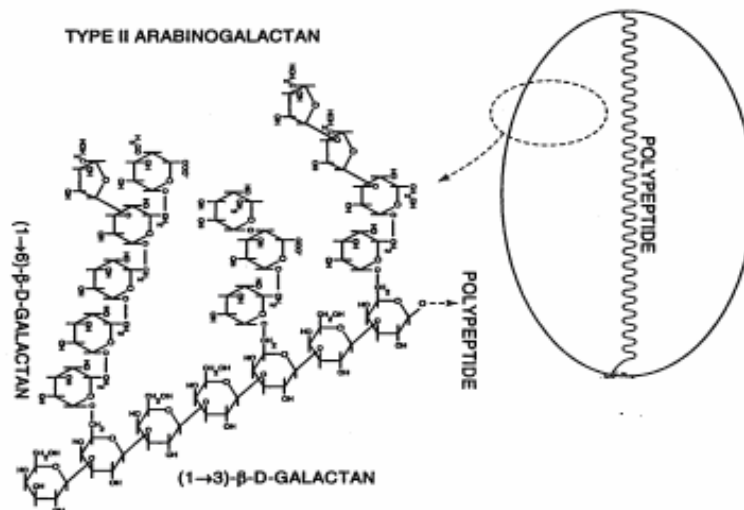
Arabinaner består av kjeder av Arabinose på furanoseform bundet sammen i α - ($1 \rightarrow 5$) binding. Forgreninger forekommer primært i posisjon C-3 og C-5, men C-2 forekommer også. En tror at Arabinan foreligger i et kompleks med galaktan, og vil spaltes av ved bruk av enzymer eller svak syrehydrolyse. Celleveggen er rik på ekso-og endo-glykanaser som enzymatisk spalter arabinogalaktaner til fritt arabinan og galaktan. [14,15]

Arabinogalaktaner

Arabinogalaktaner kan inndeles i tre grupper: arabino-4-galaktan (type 1), arabino-3,6- galaktan(type 2) og polysakkarider med sidekjeder av arabinogalaktaner (type 3). Sistnevnte er også kalt for ekte pektin. Arabinogalaktan I (AG-I) består av en hovedkjede av Gal bundet sammen i β ($1 \rightarrow 4$) binding. I Posisjon C3 bindes sidekjeder av arabinaner. Arabinogalaktan II (AG-II) består av en hovedkjede av Gal bundet til hverandre med β - $1 \rightarrow 6$ der C3 er substituert med korte sidekjeder av $1 \rightarrow 5$ bundet Araf, $1 \rightarrow 3$ bundet Gal og terminal Araf. Hovedkjeden kan også være av $1 \rightarrow 3$ bundet Gal substituert i posisjon C6 med $1 \rightarrow 6$ bundet Gal, som igjen er substituert i posisjon C3 med sidekjeder Araf. Polysakkaridkjeden kan videre være modifisert med arabinose og andre typer monosakkarider som

L-Rhamnose, D-mannose og D-xylose og D-galakturonsyre. Både AG-1 og AG-2 finnes primært som del av RG-1, begge bindes til Rha i posisjon 4.[14,15]

Arabinogalaktan-proteiner



Figur 8: Hypotetisk struktur av Arabinogalaktan protein (AGP) [20]

I plantecelleveggen kan AG II være bundet til et polypeptid rik på Hydroksyprolin, Alanin, Serin, Treonin og Glycin. Disse proteoglykanene kalles Arabinogalaktan-proteiner.(AGP). Arabinogalaktan II er bundet til kjerneproteinet på multiple seter, størrelsen varierer fra 30 til 150 monosakkarider. (Figur 8). Syntesen av AGP er svært komplekst med involvering av mange gener og modifikasjoner. Høy investering av genomet og disse modifikasjoner kan tyde på at AGP har spesifikke og viktige funksjoner i planter, men ingen eksakte funksjoner er kjent. Studier har vist effekt på cellevekst, apoptose, reproducerbar vekst, cellulær signalisering, molekylære interaksjoner og mye mer. AGP sin struktur og karakteristikk gjør det til et interessant molekyl, Yariv reagens kan brukes til å studere cellulære og molekylære funksjoner til AGP. AG II sammen med Yariv reagens danner et rødt bunnfall, denne metoden kan utføres for å identifikasjon og/eller kvantitativ bestemmelse av AG II[20]

4.4 Immunologisk aktive pektin polysakkarider

Polysakkarider isolert i fra medisinsplanter som *Echinacea purpurea*, *Angelica acutiloba*, *Bupleurum falcatum* og *Plantago major* har vist å påvirke flere deler av immunsystemet. Disse plantene har vist å kunne ha anti-komplementær effekt in vitro, men effekt på andre deler av immunforsvaret er også vist. Makrofagaktivisering er et eksempel på dette [20]. En kort innføring av immunsystemet er gitt under punkt 1.5.1-1.5.3, med primær fokus på makrofag og komplementsystemet.

4.4.1 Immunsystemet

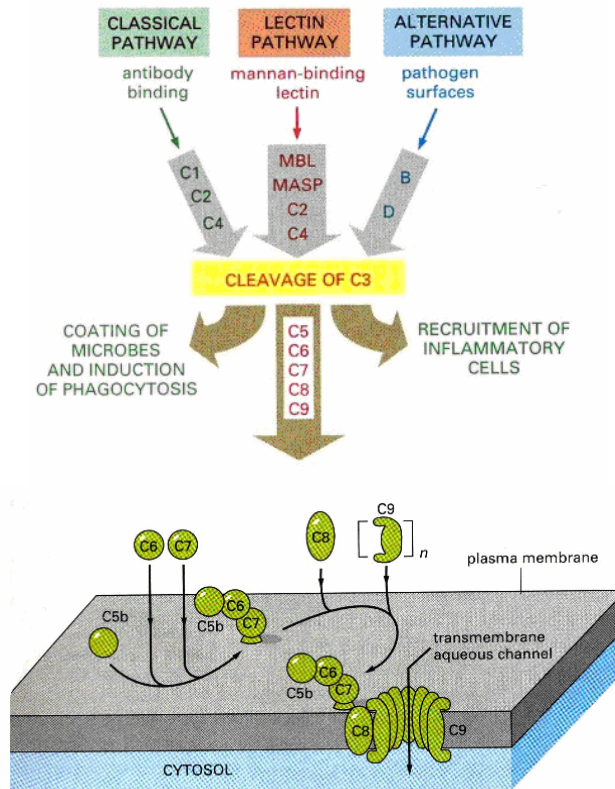
Menneskets immunforsvar mot et patogen består av det medfødte (nedarvet) og det ervervede (tillært) immunforsvar. Det medfødte immunforsvaret aktiveres hurtig og stopper de aller fleste infeksjoner i et tidlig stadium. Dette forsvaret er uspesifikt ved at det virker mot flere typer virus og bakterier, men er til gjengjeld bare aktivt over et relativt kort tidsrom og kan dessuten overlistes av enkelte patogen. Det adaptive immunforsvaret aktiveres senere i infeksjonen og virker spesifikt mot den aktuelle mikroben, men er mer effektivt og har en langvarig beskyttende effekt fordi det har hukommelse. Det medfødte immunforsvar er komplekst batteri av antimikrobielle proteiner, fagocytiske celler (makrofag og polymorfonukleære celler) samt såkalte ” naturlige drepeceller”. Hovedaktørene i det ervervede immunforsvaret er B-lymfocytter og T- lymfocytter. B- cellene gir opphav til antistoffer, mens T-cellene dreper virusinfiserte celler og stimulerer makrofagene til å drepe bakterier. [21]

Normalt er mennesket ganske motstandsdyktige mot patogene fremmedlegemer. Det skyldes at det medfødte immunsystemet stopper en infeksjon i en tidlig fase. Grunnen til at mennesket allikevel blir angrepet av et patogen kan forklares med arv og miljø. Det vil alltid være en genetisk variasjon i en populasjon, men også vil en rekke miljøfaktorer vil være av betydning. Immunforsvaret kan svekkes av dårlig kosthold, dårlig hygiene og andre ugunstige levebetingelser, samt at noen patogen har den egenskapen at de klarer å unngå eller hemme vertens forsvarsmekanismer. Følgelig vil mottakelighet og bekjempelse av et patogen være svært varierende blant individer i en populasjon. Det er vertens immunstatus som avgjør om den blir syk etter å ha blitt eksponert for en infeksjons mikroorganisme.

4.4.2 Makrofag

Makrofag er en viktig kontaktlink mellom det medfødte og ervervede immunforsvar. De er multifunksjonelle fra infeksjonens begynnelse til infeksjonens slutt. En makrofag fungerer som fagocytt, de rekrutterer andre forsvarsceller til infeksjons vev, trigger produksjon av effektormolekyler som cytokiner og kjemokiner, og de fungerer som profesjonelle antigenpresenterende celler i det adaptive immunforsvar. På den måten er makrofag en svært viktig celle i immunforsvaret. [21]

4.4.3 Komplementsystemet



Figur 9: Komplementsystemet [23]

Komplementsystemet (figur 9) inngår både i det medfødte og det ervervede immunforsvar. Komplementsystemet består av over 30 proteiner som spiller en sentral rolle i forsvaret mot patogene mikroorganismer. Noen er løst i blod og lymfe, mens andre er fastbundet i cellemembranen. Proteinene jobber etter et kaskadesystem, der et aktivert protein aktiverer neste i kjeden. Hovedkomponentene i kaskaden betegnes C1-C9, eller ved rene bokstaver B, D og H. De første komponentene i kjeden har protease aktivitet, det fører til at faktor C2-C5 spaltes i fragment a (minst) og fragment b (størst), med unntak for C2, der C2a er størst. I tillegg til hovedkomponentene C1-C9 finnes det proteiner som regulerer disse. Tre ulike reaksjonskjerer som kan aktivere komplementkaskaden er beskrevet. Disse er klassisk aktiveringsvei, alternativ aktiveringsvei og lektin-aktiveringsvei. [21,22]

Den klassiske aktiveringsvei er avhengig av et immunkompleks bestående av IgM eller IgG antistoffer bundet til et antigen. Kaskaden aktiveres når C1 binder seg til antistoffet via subkomponent C1q, dette fører til autoaktivering av C1r, som igjen kløyver C1s komponenten av C1 til sin aktive form. C1s aktiverer C4 og C2 og danner C4b2a. C4b2a er ”klassiske C3 konvertase”,

dette enzymet aktiverer C3. C3b kan bindes til C4b2a, C4b2a3b er ” klassisk C5- konvertase”.

Klassisk C5-konvertase aktiverer C5. Den alternative aktiveringsvei er antistoff-uavhengig.

Bakterier og virus har overflateegenskaper som direkte aktiverer den alternative aktiveringsvei ved å binde komplementfaktor C3, dermed gir en direkte hydrolyse av C3 på bakteriens overflate. Lektin-aktiveringsmekanismen aktiveres ved at mannose bindende lektin (MBL) binder mannoseenheter på overflaten til mikroorganismer, binding aktiverer proteaseaktivitet til MASP 1 og MASP 2. MASP 1 vil gi spontan kløving av C3, mens MASP 2 aktiverer C2 og C4. C4b2a3b dannes, som fungerer som C5 konvertase. Disse tre aktiveringsveiene på hver sin måte fører til kløyving og aktivering av komplementfaktor C3 til C3b og C3a. Etterfulgt at dette vil alle komplementaktiveringsveiene følge samme spor og aktivere og kløve komplementproteinene C5-C9 til dannelselse av membran atakk komplekset. Komplementkaskaden har mange immunologiske funksjoner, de viktigste blir omtalt i punkt 1-6.[21,22]

1: Komplementfiksering: Merke/opsonisere patogene mikroorganismer for å fremme fagocytose

Aktivering av kaskaden og de første reaksjonene er forskjellig i de tre aktiveringsmekanismene, men alle tre leder til komplementfiksering, det når komplement C3b bindes kovalent til den komponenten som først aktiverte komplementsystemet. Celler og partikler som binder C3b kan dermed lettere fagocyteres, ettersom de fagocyterende cellene har reseptorer for C3b. Komplementproteiner virker i dette tilfellet som opsoniner, da de merker fremmedstoffer slik at de kan lett oppdages av fagocyterende celler.[21,22]

2: Kjenne igjen og lysere fremmede mikroorganismer

Aktiverte komplementproteiner kan danne et kompleks som lager porer i cellemembranen, vann strømmer inn og cellen lyserer. På den måten kan mikroorganismer lyseres uten innblanding av antistoffer. Dette ”membran atakk kompleks” består av komplementfaktorene C5-C9. Lyse av bakterie kalles bakteriolyse, mens lyse av erytrocytter kalles hemolyse.[21,22]

3: Eliminasjon av immunkomplekser

Komplement kan binde sirkulerende immunkompleks (antistoff-antigen kompleks) og deretter til en erytrocytt. Når erytrocytt passerer milt eller lever, vil immunkompleks og komplement tas opp av makrofag og bli brutt ned, uten at erytrocytt blir skadet.[21,22]

4: Stimulering av det adaptive immunforsvar

Komplement kan påvirke antigenpresenterende celler til større opptak og presentering av antigen, og påvirker B celle proliferasjon. [21,22]

5: Dannelse av anafylatoksiner for å fremme inflammasjon

Aktiverer mastceller, påvirker endotelaktivitet, glatt muskulatur og rekrutterer inflammatoriske celler. Aktivisering av komplementsystemet vil dermed gi en inflammatorisk respons i tillegg til den immunologiske forsvarsmekanismen. Det betyr at et overaktivt og ukontrollert komplementsystem kan være svært uheldig og fatalt. [21,22]

4.4.4 Regulert komplementsystem

Komplement er høyt regulert. Dette innebærer å hindre aktivisering ved å gi en stopper for kompleksdannelse eller ved å spalte C3/C5 konvertase. Klassisk C1 inhibitor hemmer tidlig i komplementkaskaden, C4 bindende protein spalter C3/C5 konvertase og CD59 hemmer ”membran angrep kompleks” [21]

Eksogene substanser kan også påvirke komplementsystemet. Når humant blod tilsettes en komplementregulerende substans kan komplement aktivitet måles ved å se på grad hemolyse av erytrocytter. Substanser som regulerer hemolytisk aktivitet av komplement omtales som ”antikomplementære” substanser. De antikomplementære substanser er både de som aktiverer og de som inhiberer komplementsystemet. En komplementaktivator vil gi redusert hemolyse, mens er komplementinhibitor vil gi økt hemolyse. [24]

4.4.5 Anti-komplementære pektinpolysakkarider: Struktur og aktivitet.

Antikomplementær aktivitet til pektinpolysakkarid fraksjoner fra en rekke medisinsplanter er vist å være svært forskjellig. Struktur- aktivitet studier viser både til aktivitet på den klassiske komplementaktiveringsvei og den alternative aktiveringsvei, men aktiviteten er svært varierende fra medisinsplante til medisinsplante. Noen pektinfraksjoner viser til anti-komplementær effekt på begge veier, mens andre viser til aktivitet på kun en eller ingen av veiene. Basert på disse resultatene kan en anta at det er visse strukturelle trekk av pektinmolekylene som er viktig for den anti-komplementære aktiviteten og ikke pektinmolekylet i sin helhet. For alle pektin fraksjoner er det vist at sidekjeder er svært viktig for aktivitet.[15,24]

Rhamnogalakturonaner med anti-komplementær effekt har blitt isolert i fra planter som *Angelica acutiloba*, *Bupleurum falcatum* og *Panax ginseng*. RG I har vist aktivitet på både på den alternative og den klassiske aktiveringsvei. De strukturelle deler av pektinpolysakkaridet som antas å være ansvarlig for denne aktiviteten er de såkalte "hårete område". Det er mye som tyder på at "glatte område" virker modulerende på aktiviteten til "hårete område", det er vist for RG-II at grad metylesterfisering i RG-I og hyppighet av forgreninger i "glatte område" virker inhiberende på aktiviteten.[15,24]

Arabinogalaktaner med anti-komplementær aktivitet har blitt isolert i fra blant annet *Angelica acutiloba*, *Panax ginseng* og *Plantago major*. I de aller fleste studier er det AG II som viser til aktivitet, og det antas at Gal (1,3,6) er et minimum for aktivitet. Araf har vist å virke inhiberende på den klassiske aktiveringsvei. Det er vist at acetylgrupper inhiberer aktivering av klassisk aktiveringsvei, at antall hydroksylgrupper øker aktivitet på alternativ vei og at karboksylsyrer er essensielt for at den klassiske vei skal aktiveres. Karboksylsyrer og metylester fordeling er med på bestemme den tredimensjonale strukturen til pektin molekylene, og mye tyder på at den tredimensjonale strukturen påvirker aktivitet.[15,24]

5. Etnofarmakologisk baserte søk i Mali

5.1 Innledning

Jordas mangfold av arter, gener og økosystemer er svært verdifullt for menneskene. Det biologiske mangfoldet er kilde til mange kommersielle produkter, som mat, farmasøytiske produkter og kosmetikk. Effekten av mange registrerte legemidler er ikke lenger gode nok og resistensproblematikk til de antimikrobielle legemidler har blitt mer og mer aktuelt. Nye produkter som kan løse problemer relatert til sult, helse og sykdom må derfor utvikles.

I dag vies stor oppmerksomhet til naturens egne kjemikalier som utgangspunkt for utviklingen av moderne medisiner. WHO har estimert at 25 % av alle registrerte legemidler har tatt i utgangspunkt i planter som er foredlet på tradisjonelt vis i fattige land gjennom århundrer. En stor del av verdens befolkning er avhengig av tradisjonell medisin. Anslått av WHO benytter opp til 80 % Afrikas populasjon tradisjonell medisin i sin primære form for helsetjeneste.[25]

Interessen for tradisjonell medisin har blomstret opp i de industrialiserte land, der over 50 % av populasjonen har prøvd såkalt alternativ medisin minst en gang. Årsaken til dette er multifaktorielt, men mye av den økte interessen kan forklares med en økt bevissthet for betydningen av jordas mangfold, ansvarsfølelse for egen helse, og håpet om en forlenget ungdom og det ”evige liv”. Vi skal ikke lang tid tilbake der folk i vesten forbandt sykdom med Guds straff for synder, og at troen på at bønner førte til helbredelse. I dag står kristendommen på vaklende grunn. I stedet føler folk skyld ved sykdom på grunn av usunn livsførsel. En kan si at medisinen er blitt vår tids ”religionserstatning” i søken etter evig liv.

”Screening”, ”random screening” eller ”targeted screening” er to ulike metoder som brukes til å søke etter bioaktive naturstoffer. De målrettede søk inkluderer etnofarmakologisk baserte søk og er signifikant mer effektivt sammenliknet med de tilfeldige søk.[24].

I november og desember 2007 ble det gjennomført etnofarmakologiske studier i Mali. I denne delen av oppgaven vil det bli gitt en kort beskrivelse av begrepet etnofarmakologi og betydning av etnofarmakologisk baserte søk. Fakta om Mali og en beskrivelse av tradisjonell medisin i Mali vil bli gitt, herunder blir ”Department of traditional medicine” (DMT) omtalt. Videre følger en kort beskrivelse av tidligere funn på *Syzygium Guineense*, og til slutt vil informasjon, resultat og kvalitative og kvantitative analyser av resultatene bli gitt.

5.2 Etnofarmakologisk baserte søk- en kilde til nye legemidler og ny kunnskap

Etnomedisin er kunnskaper, forestillinger og tradisjoner vedrørende sykdom, sykdomforebyggelse, behandling og helbredelse som er knyttet til en bestemt folkegruppe. Slike kunnskaper og tradisjoner overføres fra generasjon til generasjon, men gjennomgår også forandringer som følge av samfunnsendringer og ved kontakt med utøvere fra andre medisinske kunnskapstradisjoner.

Etnomedisin henter i hovedsak sin legekunst fra to kilder, naturen og magien. Etnomedisin bæres oppe av en logikk nedfelt i kulturen. Alt liv på jorda henger sammen slik at planeten oppfattes som en levende enhet. En tradisjonell healer må ta utgangspunkt i pasientens indre kjerne og bruke naturen og magien til hjelp for å bevare eller gjenvinne god helse. Naturens planter er virksomme for menneskenes lidelser gjennom spising, inhalering eller applisering på hud, men vel så viktig er ritualene som er motivert av ønske om å oppnå en bestemt effekt.

Etnofarmakologiske studier tar for seg studier av medisinplanter, deres komplekse ekstrakter og hvordan de tradisjonelt anvendes i ulike kulturer og etniske grupper. Etnofarmakologi er et meget tverrfaglig forskningsområde, der antropologer, botanikere, farmakognostikere, organisk kjemikere, farmakologer, analytisk kjemikere og mye mer arbeider i stort felleskap. Etnofarmakologisk baserte søk inkluderer feltarbeid og intervju med tradisjonelle healere.[26,27].

Detaljerte intervju med tradisjonelle healere har ledet frem til de mest verdifulle plantene. Som eksempel viser Shaman Pharmaceuticals til at omlag 50 % av deres innsamlede planter med et terapeutisk potensial er et resultat av å snakke med tradisjonelle healere. Amerikanske Michael Balick har anslått at 57 % av alle legemidler er derivert i fra naturen, 78 % av alle antibakterielle midler og 61 % av alle legemidler mot kreft er derivert i fra naturen. Etnofarmakologiske studier er dermed en vei å gå for å finne det ultimative legemiddelet mot en eller flere sykdommer. Det finnes flere eksempler på etnofarmakologiske studier som har ført til legemidler med vid utbredelse i moderne medisin. Morfin, Kodein, Acetylsalisylsyre, Vinkristin, Vinblastin, Digoxin og Kinin er eksempler på legemidler som er derivert i fra naturen og som er funnet ved bruk av etnofarmakologisk baserte søk.[28]

Etnofarmakologiske studier er viktig for bevaring av biologisk mangfold. Det er et tankekors at jordens arter, og ikke minst plantearter, utryddes i et svimlende tempo akkurat nå. Estimert av "The international union for the conservation of nature" er 1/8 av alle planter truet med å bli utryddet. Mange av disse plantene har aldri blitt registrert, andre har aldri blitt evaluert for biologisk aktivitet. Vi vet fortsatt veldig lite om det biologiske mangfoldet vi har på jorda. Etnofarmakologiske studier er spesielt viktig for å kunne fortsette med å systematisere det biologiske mangfoldet.[28]

5.3 Mali



Figur 10: Bilder tatt i Mali desember 2007

Republikken Mali er et stort land som ligger midt i Vest Afrika. Hovedstaden i Mali er Bamako, som også er den største byen i Mali. Folketallet ble i juli 2007 estimert til å være i underkant av 12 millioner, med en årlig vekstrate på 2,68 %. Omtrent halvparten av befolkningen er under 15 år, snittalderen er 15,9 år og gjennomsnittelig levealder 49,51 år. Omtrent 90 % av befolkningen er muslimer, 1 % er kristne og 9 % har lokal tro. Mali er en tidligere fransk koloni som ble uavhengig 22. september 1960. Fransk er derfor det offisielle språk, men 80 % snakker også Bambara, i tillegg finnes det mange andre afrikanske språk. Det er mange forskjellige etniske grupper i Mali, Mande inkluderer bambara, malinkè og soninkè og utgjør ca 50 % av befolkningen. Det er svært varmt og tørt i Mali, 65 % av landet er ørken eller halvørken. Den sørlige delen av landet har savannelandskap og har et noe fuktigere klima, størsteparten av befolkningen bor her. I Sør finnes de to kjente elvene Senegal og Niger. At landet er så tørt gjør det vanskelig å leve, både for mennesker og dyr. Tørken fører ofte til matmangel. Infeksjoner og parasitter er et stort helseproblem i Mali, mange blir dårlige på grunn av dårlig mat og drikkevann. Mali er et av verdens fattigste land og er avhengig av å motta bistand fra de rikere land.[29]

5.4 Tradisjonell medisin i Mali / " Department of traditional medicine" (DMT)

Ved sykdom eller andre problem relatert til helse velger fortsatt et signifikant antall mennesker i Mali tradisjonell medisin i sin primære form for helsevesen. Årsaken til dette kan være mange, men en hyppig årsak er liten tilgang til moderne medisin og dårlig økonomi.

Healervirksomheten i dag er svært preget av Malis historie og en snakker ofte om healing før, under og etter kolonitiden. Før kolonitiden var tradisjonell medisin det eneste eksisterende helsevesen i Mali. De tradisjonelle healerne hadde høy sosial status i samfunnet, og de kunne drive sin virksomhet i fred og ro. Under kolonitiden måtte de tradisjonelle healerne fortsette healing i hemmelighet. De franske kolonistene tillot ikke slik virksomhet, og det vokste en mistro til det tradisjonelle systemet i Mali. Etter kolonitiden fikk de tradisjonelle healerne sin frihet tilbake. Et uavhengig Afrika ble opptatt av å styrke sin identitet, samt å oppfordre sine egne til å ivareta og verdsette sin kultur. Det ble satt i gang omfattende forskning på tradisjonell medisin i Mali.

I 1968 ble institutt for fytoterapi opprettet i Mali, det første institutt for forskning på landets medisinplanter. I 1973 byttet institutt for fytoterapi navn til " Nasjonal forskningsinstitutt på farmakope og tradisjonell medisin". Etter mange endringer går i dag institusjonen under navnet "Departement for tradisjonell medisin" (DMT), underlagt Nasjonalt institutt for forskning på folkehelse (INRSP). DMT ble en av WHO sine samarbeidspartnere på tradisjonell medisin.

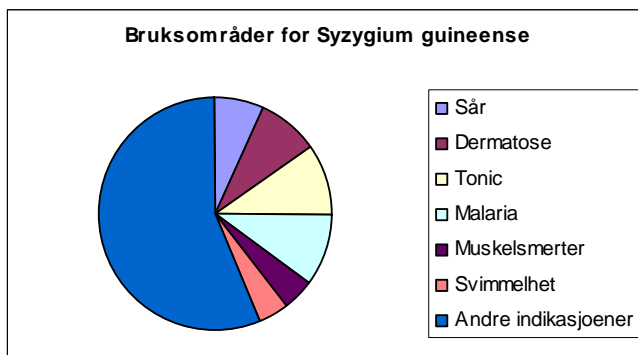
Et av DMT sine primærmål er å etablere en mekanisme for å sikre at tradisjonell medisin skal være komplementært til konvensjonell medisin. De arbeider med den tro at medisin kan produseres fra lokale ressurser, spesielt fra medisinplantene. De ønsker å forbedre formuleringer av medisinplantene, undersøke for effekt, toksikologi, farmakologi og fytokjemi, og ikke minst gi healere som besitter mye kunnskap større status i samfunnet. For å nå dette målet har de satt i gang et stort prosjekt med å registrerte tradisjonelle healere og deres medisinplanter i sitt datasystem. Over 1200 plantearter har gjennom disse etnofarmakologiske studiene blitt registrert i deres bibliotek. Flere enn 100 masteroppgaver er skrevet ved universitetet i Mali. DMT har også inngått i et sør-nord samarbeid, blant annet med Oslo og Toulouse. Under dette samarbeidet har flere studenter ved universitet i Mali tatt sin doktorgrad ved universitet i Oslo, samtidig har etnofarmakologiske studier i Mali vært del av hovedfag og doktorgradsoppgaver ved universitetet i Oslo siden 1996. [30,32]

5.5 Tidligere funn

Det ble i januar og februar 2006 utført etnofarmakologiske studier på *Syzygium guineense* i Kolokani og Dioila- området i Mali. 45 healere ble intervjuet, henholdsvis 16 healere i Kolokani og 29 healere i Dioila. I Kolokani brukte kun 2 av 16 healere *S. guineense*, kun 9 healere kjente til planten. Ingen av disse healerne brukte *S. guineense* mot dermatoser, sår eller andre hudlidelser. I Dioila brukte 19 av 29 healere *S. guineense*. *S. guineense* ble brukt til behandling av dermatoser av 3 healere og til sårbehandling av 4 healere. Både blader og stammebark ble brukt mot begge indikasjonene. Det betyr at underkant at 50 % av healerne som ble intervjuet i Kolokani og Dioila området i januar og februar 2006 brukte *S. guineense*. Av disse brukte 33 % av healerne *S. guineense* mot dermatose og til sårbehandling. [1]

I mars og april 2007 ble en ny etnofarmakologisk studie utført på *S. guineense*. Denne gangen i Dioila og Koutiala- områdene. Til sammen ble 57 healere intervjuet, henholdsvis 37 healere i Dioila- området og 17 healere i Koutiala- område. I Dioila området brukte 21 av 37 healere *S. guineense*. Av de brukte 3 healere blader mot dermatose og 1 healer brukte blader mot sår. Hyppigst forekommende ble *S. guineense* brukt i Tonic for å gi styrke hos svake pasienter, blader ble i alle disse tilfeller brukt. I Koutiala-område brukte 9 av 17 healere *S. guineense*, alle til ulike indikasjoner. Ingen av healerne brukte *S. guineense* mot dermatoser, sår eller andre hudlidelser. Det betyr at overkant av 50 % av de intervjuede healerne brukte *S. guineense*. 10 % av disse brukte *S. guineense* mot dermatose, men sårbehandling som indikasjon ble nevnt i kun ett tilfelle. [32]

Ved å se på totalen av disse to etnofarmakologiske studiene har 102 healere blitt intervjuet. 50 % av disse brukte *S. guineense* mot 46 forskjellige indikasjoner. Av disse brukte ca 22 % av healerne *S. guineense* mot dermatose og/eller til sårbehandling. Figur 11 viser at de hyppigst forekommende bruksområdene for *S. guineense* er tonic, malaria, sår, dermatose, muskelsmerter og svimmelhet. Den største delen i sektordiagrammet viser til 40 forskjellige indikasjoner og utgjør hele 78,4 %. Antall indikasjoner er for stor til kunne differensiere mellom dem, slik at et tallfestet resultat vil ikke gi en pekepinn på en spesifikk indikasjon *S. guineense* bør undersøkes for, derimot kan en identifisere et mønster med mange nevnte indikasjoner der immunforsvaret involvert. Effekt på immunsystemet kan være en teoretisk idé, men må undersøkes nærmere ved videre etnofarmakologiske studier og immunologiske tester.



Figur 11: Samlet resultat fra tidligere feltarbeid i Mali: januar og februar 2006 og mars og april 2007.

5.6 Feltarbeid

I løpet av november og desember 2007 ble 2 feltarbeid utført. Det ble bestemt å intervju totalt 60 healere, der hver healer ble spurt om 4 ulike planter. Totalt tok studien for seg 8 planter, 4 planter ble selektert for begge feltarbeid. Det første feltarbeidet ble utført i Siby og landsbyene nær Siby i perioden 2-3 desember 2007. 27 healere ble intervjuet om 4 følgende planter:

- *Biophytum persantianum*
- *Combretum glutinosum*
- *Opilia celtidifolia*
- *Syzygium guineense*

Det andre feltarbeidet ble utført i landsbyer i og omkring Dioila i perioden 12-13 desember 2007. 31 healere ble intervjuet, 30 av disse ble intervjuet om 4 følgende planter:

- *Combretum molle*
- *Ximenia americana*
- *Cola cordifolia*
- *Parkia biglobosa*.

1 healer i Dioila ble spurt om de 4 førstnevnte plantene, dette for å oppnå målet om 30 intervju for hver plante. I tillegg til feltarbeid i Siby og Dioila ble 1 healer i Bamako og president for healer assosiasjonen i Kati intervjuet, begge disse om de 4 førstnevnte plantene.

Dr.pharm Drissa Diallo var med oss på intervjuene i Siby, i Bamako og Kati, mens Dr.pharm Sekou Bah var med oss til Dioila området. De var intervjuere og oversettere for oss. Alle intervju ble gjennomført på lokale språk, hovedsakelig Bambara. I tillegg var DMT sin botaniker N'golo Balo med oss på begge feltarbeid, han var med på intervju healere i Dioilaområde, da Dr.pharm Sekou Bah ikke har Bambara som sitt native språk.

Feltarbeid i Siby og Dioila ble bestemt med hensyn på *S.guineense*, da tilgjengeligheten til *S.guineense* er begrenset til områder rik på lys og fuktighet. Kun informasjon om *Syzygium guineense* er tatt med i denne oppgaven, og fokuset vil rettes spesielt mot sykdom assosiert med hud. (Sår, dermatoser og andre hudlidelser). Alle healerne lot seg frivillig intervju og ble kompensert for

meddelt informasjon og kunnskap med 2000 CFA og en pose med hvite og røde Cola nøtter. Healerne signerte før hvert intervju, og det ble tatt fingeravtrykk av de healerne som ikke kunne skrive. (Figur 12) For hver av plantene ble det spurt om:

- Indikasjon
- Del av planten som benyttes
- Fremstilling av preparat
- Bruk av preparat
- Dosering



Figur 12: DMT sin botaniker N`golo Balo tok fingeravtrykk av en tradisjonell healer som ikke kunne skrive


5.7 Resultater og diskusjon

I tabell 2-5 fremstilles resultatene for healerintervju gjennomført i Mali november og desember 2007. Hver tabell representerer de 4 lokalisasjoner i Mali der healerintervju ble gjennomført, kun resultatene fra *Syzygium guineense* er tatt med her.

1: Resultat i fra healerintervju i Kati, 15 km fra Bamako. Utført 26 /11- 2007.

Lokalt navn på *Syzygium guineense*: Koguria


Tabell 2: Resultat fra healerintervjue i Kati

Foto og opplysninger om healer	Indikasjon, preparasjon og dosering
 <p>Navn: Tjenegùè Souleynane Diana (66)</p> <p>(President for healer assosiasjonen)</p> <p>Landsby: Kati</p> <p>Antall år erfaring: 46 år</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall indikasjoner: 8</p>	<p>I: Psykiske lidelser</p> <p>Lager dekokt av tørket blader, kroppen vaskes med dekokt før 1 tekopp drikkes.</p> <p>II: Angst og uro</p> <p>Brenner blader på ild og røyken pustes inn.</p> <p>III: Ryggsmarter (Lumbago)</p> <p>Lager et hull i bakken der en blanding av blader og rot brennes. Ryggen rettes i mot dette hullet, slik at røyken kommer i kontakt med ryggen.</p> <p>IV: Svakt barn</p> <p>Lager dekokt av blader og stammebark og 1 teskje drikkes 3 ganger daglig, deretter vaskes kroppen med dekokt.</p> <p>V: Indre sår / magesår</p> <p>Lager dekokt av blader. For interne sår drikkes 1 håndfull 3 ganger daglig, for magesår drikkes 1 håndfull 1 gang daglig.</p> <p>VI: Søvnløshet</p> <p>Tørket blader brennes. Lar et tildekket hode komme i kontakt med røyken.</p> <p>VII: Lokal soppinfeksjon</p> <p>Lager dekokt av pulveriserte blader. Vasker kroppen med dekokt og appliserer på sopp.</p> <p>VIII: Sår under nesa og sår i munn</p> <p>Pulveriserer blader og appliserer på sår.</p>

II: Resultat i fra healerintervju i Bamako. Utført 27/11- 2007.


Lokalt navn på *Syzygium guineense*: ko kissa

Tabell 3: Resultat fra healerintervjue i Bamako

Foto og opplysninger om healer	Indikasjon, preparasjon og dosering
 <p>Navn: Sylliah Mamby Traorè (40)</p> <p>Landsby: Bamako</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 40</p> <p>Antall indikasjoner: 2</p>	<p>I: Ammenorè:</p> <p>Lager dekokt av tørket eller ferske blader og blander dette inn i kjøttsuppe. Drikkes 2 ganger daglig</p> <p>II: Dysmenoré:</p> <p>Lager dekokt av tørket eller ferske blader, tilsetter salt og drikker ½ liter 3 ganger daglig.</p>




Resultat i fra healer intervju i Siby. Utført 2-3/12- 2007





Tabell 3: Resultat fra healerintervjue i Siby


Foto av healer	Opplysninger om healer	Indikasjon, preparasjon og dosering
	<p>Navn: Niagalè Camara (55)</p> <p>Landsby: Jisumala</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Nei</p> <p>Antall år erfaring: 50</p> <p>Antall indikasjoner: 0</p>	

	<p>Navn: Nagnouma Keita (58)</p> <p>Landsby: Dogoro</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Nei</p> <p>Antall år erfaring: 15</p> <p>Antall indikasjoner: 0</p>	
	<p>Navn: Fatouma Keita (68)</p> <p>Landsby: Dogoro</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Nei</p> <p>Antall år erfaring: 40</p> <p>Antall indikasjoner: 0</p>	
	<p>Navn: Bougori Coulibaly (65)</p> <p>Landsby: Gouena</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Nei</p> <p>Antall år erfaring: 20</p> <p>Antall indikasjoner: 0</p>	
	<p>Navn: Sidiki Coulibaly (57)</p> <p>Landsby: Savakoro</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 45</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I:Kolera</p> <p>Tørker <u>blader</u> over 24 timer, pulveriserer og blander pulver med vann og drikker</p>

	<p>Navn: Sakaba Camara (68)</p> <p>Landsby: Jisumala</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 40</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Infertile kvinner</p> <p>Tørker frukt og pulveriserer. Tar 2 fingerklyp pulver og blander i kaffe. Drikker hver morgen over tid.</p>
	<p>Navn: Nèguè Coulibaly (75)</p> <p>Landsby: Jisumala</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 20</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Lepra</p> <p>Lages dekokt av <u>blader</u> og stammebark. Drikker ½ liter og vasker kroppen med resten. Utskifter blader og stammebark hver uke inntil 3 uker til 3 år.</p>
	<p>Navn: Farima Konè (80)</p> <p>Landsby: Jisumala</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 30</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Astma</p> <p>Lager dekokt av en bunt med <u>blader</u>. Heller dekokt i en liten kopp, tar litt salt på tungen og inhalerer dampen.</p>
	<p>Navn: Massaba Konè (83)</p> <p>Landsby: Jisumala</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 50</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Astma</p> <p>Blander <u>blader</u> og stammebark og lager dekokt. Tar dampbad og vasker kroppen med dekokt. 3 håndfull dekokt drikkes 3 ganger daglig</p>



	<p>Navn: Koraba Traor (60)</p> <p>Landsby: Jisumala</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 25</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Dermatose</p> <p>Lager dekokt av 2 bunter med <u>blader</u>. Tar dampbad og vasker kroppen. Tar dampbad og vasker kroppen 2 ganger daglig. Bunter byttes hver 4. dag.</p>
	<p>Navn: Salimata Reita(67)</p> <p>Landsby: Jisumala</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 10</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: <i>Onkoserka Volvilus</i> (parasitt)</p> <p>Lager dekokt av 3(4) bunter med <u>blader</u> i en stor kopp. Brukes til dampbad, til å vaske kroppen og drikker 1 gang daglig inntil symptomfrihet. Bunter byttes ut hver 3-4. dag.</p>
	<p>Navn: Tantan Camara (49)</p> <p>Landsby: Gouena</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 34</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Infertile kvinner</p> <p>Lager en bunt av <u>blader</u>, rot, stammebark og frukt. Tørker hver bunt før finpulverisering. 1 teskje pulver blandes i grøt. En porsjon spises hver morgen under blødningsperioden.</p>

	<p>Navn: Talama Camara(27)</p> <p>Landsby: Siby</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 10 år (jobber med sin far)</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Hypertensjon (som er bekreftet av lege)</p> <p>Tørker stammebark. 1 håndfull bark til en tekopp, fyller opp med vann, koker i 10 min, så filtrerer.</p> <p>Væskemengden deles i 2, en del 1 drikkes morgen og del 2 drikkes kveld.</p>
	<p>Navn: Modibou Camara(45)</p> <p>Landsby: Siby</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 8</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Dermatose</p> <p>En mengde stammebark deles opp i 2 like store deler. Del 1 kokes og kroppen vaskes med dekokt. Del 2 pulveriseres og pulver blandes med seabutter. Påsmøres på huden 1 gang daglig.</p>
	<p>Navn: Maimona Coulibaly(62)</p> <p>Landsby: Siby</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 30</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Astma</p> <p>Lager dekokt av 1 bunt med <u>blader</u>. Tar et dampbad, vasker kroppen og drikker 1 håndfull 1 gang daglig</p>
	<p>Navn: Djala Karunga(66)</p> <p>Landsby: Dogoro</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 40</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Malaria</p> <p>Lager dekokt av <u>blader</u> eller stammebark. Noe av dekokt drikkes, restere vasker kroppen med. Pulveriserer noe, 3 fingerklyp blandes i kaffe, grøt eller varmt vann og drikkes hver morgen.</p>

	<p>Navn: Koussa Keita(60)</p> <p>Landsby: Dogoro</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 10</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Tonic</p> <p>Lager dekokt av 3-4 bunter med <u>blader</u>. Ingen begrensning på mengde blader eller vann. Drikker og vasker kroppen med dekokt</p>
	<p>Navn: Coumba Camaro(58)</p> <p>Landsby: Dogoro</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 23</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Feber og søvnvansker</p> <p>3 (4) bunter <u>blader</u> kokes i 4 l vann i 1 time. Vasker kroppen med dekokt og drikker ½ liter hvis voksen, og 1 teglass hvis barn.</p>
	<p>Navn: Mansaman Camara(64)</p> <p>Landsby: Gouena</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 4</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Sår i munn og ytre sår</p> <p>Lager dekokt av stammebark, vasker såret med dekokt, deretter appliseres dekokt på såret 1 gang daglig</p>
	<p>Navn: Bobo Camara(80)</p> <p>Landsby: Gouena</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 48</p> <p>Antall indikasjoner: 1</p>	<p>I: Tonic</p> <p>Lager dekokt av 3(4) bunter med <u>blader</u>. Dekokt drikkes over tid, til styrken og energien kommer gjenvinnes.</p>


	<p>Navn: Natenum Camara(70)</p> <p>Landsby: Jisumala</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 5</p> <p>Antall indikasjoner: 2</p>	<p>I: Onkoserka Volvilus (parasitt): Lager dekokt av 3 bunter med <u>blader</u>. Vasker kroppen og drikker dekokt. Ingen begrensning på mengde og behandlingstid. Bytter bunter hver 4. dag.</p> <p>II: Astma</p> <p>Lager dekokt av 1 bunt <u>blader</u>. Tar litt salt på tungen og inhalerer damp 2 ganger morgen og kveld.</p>
	<p>Navn: Lamine Keita(46)</p> <p>Landsby: Dogoro</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: Under opplæring.</p> <p>Antall indikasjoner: 2</p>	<p>I: Pneumoni, feber og bryst smerter</p> <p>Lager dekokt av 3(4) bunter <u>blader</u>. Tar dampbad og drikker dekok.</p> <p>II: Insomnia</p> <p>Tørker rotbark og stammebark. Lager en bunt og blander med isens. Tenner på og puster inn røyken.</p>
	<p>Navn: Nasira Keita</p> <p>Alder: 60 år</p> <p>Landsby: Gouena</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 3</p> <p>Antall indikasjoner: 2</p>	<p>I: Generell smerte og Tonic</p> <p>Lages dekokt av <u>blader</u> i en kopp, mengden er ubegrenset. Tar dampbad og drikker dekok etter dampbadet.</p> <p>II: Pneumoni</p> <p>Lager dekokt av <u>blader</u> i en kopp, mengden er ubegrenset. Tar dampbad.</p>

	<p>Navn: El Hadj Mèchèri Camara (57)</p> <p>Landsby: Gouena</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 15</p> <p>Antall indikasjoner: 2</p>	<p>I: Smerter i Abdomen</p> <p>Lager pulver av stammebark eller rot. 3 fingerklyp md pulver blandes med grøt, kaffe eller kjøtt.</p> <p>II: Infertile kvinner</p> <p>Lager pulver av stammebark eller rot. 3 fingerklyp md pulver blandes med grøt, kaffe eller kjøtt.</p>
	<p>Navn: Lamine Coulibaly (56)</p> <p>Landsby: Jinkori Sobeni</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: 40</p> <p>Antall indikasjoner: 3</p>	<p>I: Hud-infeksjoner</p> <p>Lager dekokt av 3(4) bunter med <u>blader</u>. Vasker kroppen med dekok 3-4 ganger daglig.</p> <p>II: Varmer føtter</p> <p>Lager dekokt av rot for dampbad av føttene.</p> <p>III: Astma</p> <p><u>Blader</u> blandes med ingefær og tørkes og pulveriseres. 1 suppeskje pulver blandes i 3 teglass med vann og filtrerer. Voksne drikker 1 suppeskje, og barn drikker 1 teskje.</p>

	<p>Navn: Frafriba Doumbia (70)</p> <p>Landsby: Siby</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: ca 7 år</p> <p>Antall indikasjoner: 3</p>	<p>I: Leprosi</p> <p>3(4) bunter med <u>blader</u> og små mengder rot kokes. Vasker kroppen med dekokt, og drikker et ½ teglass daglig inntil bedring. Hver bunt byttes ut hver 5. dag.</p> <p>II: Feber</p> <p>Dekokt eller masserasjon av blader til å vaske kroppen 1 gang daglig.</p> <p>III: Dermatose</p> <p>Lager dekokt eller masserasjon av <u>blader</u>. Vasker kroppen 1 gang daglig.</p>
	<p>Navn: Boucari Keita (110)</p> <p>Landsby: Gouena</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Ja</p> <p>Antall år erfaring: Livslang</p> <p>Antall indikasjoner: Bruker <i>Syzygium guineense</i> mot alle indikasjoner</p>	<p>Til alle indikasjoner</p> <p>I et teglass blandes stammebark med vann fra den elva der <i>Syzygium guineense</i> vokser ved. Drikker dette hver morgen.</p>

Resultat i fra healerintervju i Dioila 12-13 desember 2007

Tabell 4: Resultat fra healerintervjue i Dioila

Foto av healer	Opplysninger om healer	Indikasjon, preparasjon og dosering
	<p>Navn: Douthi Konaté (45)</p> <p>Landsby: Siri Mabougou</p> <p>Bruk av <i>Syzygium guineense</i>: Nei</p> <p>Antall år erfaring: 3</p> <p>Antall indikasjoner: 0</p>	

Forklaringer og kommentarer til tabell 1-4

Formuleringer

- **Teglass:** Også omtalt som Glass nr 8, rommer ca 75 ml
- **3 (4):** 3 enheter hvis mann og 4 enheter hvis dame. Det ble fortalt at kvinner blir hardere rammet av sykdommer enn menn, derfor må de ha større mengder plantemateriale for å bli frisk.
- **Bokstav i parentes:** m betyr mann og k betyr kvinne.
- **Fingerklyp:** Antall fingerklyp vil si antall fingrer som brukes til å lage en klype, et mål for mengde plantemateriale som skal benyttes.
- **Masserasjon:** Planter kaldt vann og plantematerialet og drikker dette etter en stund.
- **Dekokt:** Koker plantematerialet i vann og drikker kokevannet
- **Fumigasjon:** Tørket plantematerialet brennes og røyken inhaleres.

5.8 Diskusjon av resultatene

Denne etnofarmakologiske studien går ut på å kartlegge bruk av *S. guineense*, og dette spesielt til sårheling og andre hudlidelser. Håndtering og tolkning av datamaterialet etter denne etnofarmakologiske studien er utfordrende og ikke uten problem. Fra tidligere arbeid på *S. guineense* ble resultatene tolket både kvantitativt og kvalitativt. Studiene har belyst spørsmål som ”hvor mange tradisjonelle healere bruker *S. guineense*”, ”hvor mange healere bruker *S. guineense* til sår, dermatose og andre hudlidelser”, ”hva er den hyppigst nevnte indikasjonen” og ”hvor stor del bruker *S. guineense* til andre indikasjoner enn sår og dermatoser”. Det ble så besluttet at antall indikasjoner til *S. guineense* er så stor at det blir vanskelig å differensiere mellom dem. Samme beslutning ble foreslått når resultat fra to forskjellige etnofarmakologiske studier ble slått sammen. Resultatene er i disse tilfeller er tolket kvantitativt. En kvantitativ analyse av resultatene krever et representativt utvalg, og en klar hypotese å følge. Et feltarbeid alene gir ikke et utvalg som er representativ for tallanalyse, samtidig foreligger det ingen klar hypotese. Det betyr at datamaterialet må bli sett på gjennom ulike briller og følge en annen logikk enn det en kvantitativ analyse gjør.

Det foreligger en teori om at *S. guineense* kan ha noen komponenter med kommersiell verdi, men planten er tidligere lite undersøkt for dette. Det betyr at det kreves ”dybde informasjon”, og det eneste riktige er å tolke resultatene kvalitativt. Intervju av tradisjonelle healere er ”kategorisk representative”, et stort utvalg er ikke nødvendig da det i første omgang kun søkes etter et mønster som kan lede til en teoretisk ide ved hjelp av healernes erfaringer, kunnskap, opplevelser, holdninger og tanker. Til undersøkelsen er det rekruttert tradisjonelle healere innenfor et geografisk område, disse vil være ”kategorisk representative” for studien.

Resultat fra tidligere utført arbeid på *S. guineense* ble det foreslått en teoretisk ide om at *S. guineense* kan påvirke immunsystemet. Resultatene fra denne etnofarmakologiske studien vil her bli brukt for å belyse spørsmål fra tidligere utført arbeid, og til undersøkelse om de resonnementer ved tidligere utført arbeid kan være gyldig.

Resultat i fra den etnofarmakologiske studien utført november-desember 2007 blir vurdert kvalitativt, men resultat fra alle utførte healerintervju i perioden 2006-2007 blir vurdert kvalitativt og kvantitativt.

5.9 Kvalitativ undersøkelse av resultatene fra feltarbeid utført desember 2007



Figur 13: Bilder fra første feltarbeid utført i Siby og landsbyene nær Siby

27 av 30 intervju ble gjennomført i Siby (Figur 13) og i landsbyene nær Siby, for å få minst mulig påvirkning fra enkeltintervju fra 3 andre landsbyer i Mali (Dioila, Bamako, Kati) vil kun resultatene fra Siby diskuteres. Resultat fra enkeltintervju vil kun bli tatt med i en større sammenheng, når resultatene fra alle utførte feltarbeid diskuteres.

Kati

President for healerassosiasjonen fra Kati er en healer med høy status i healer miljøet, han brukte *S. guineense* mot 8 forskjellige indikasjoner, 6 av disse indikasjonene ble ikke nevnt i Siby, 1 av de nevnte indikasjonene var sår, til dette brukte han blader.

Bamako

I Bamako har far og sønn Traorè valgt å modernisere healervirksomheten, der de blant annet markedsfører seg selv med egen nettside (www.amprit.blogspot.com). Flere plantedeler ble i de fleste tilfellene brukt i samme preparat. Preparat med *Syzygium guineense* ble brukt mot 2 indikasjoner: Ammenoré og Dysmenoré. Denne indikasjonen er kun blitt nevnt av Traorè. Per dags dato vil dermed ikke disse resultatene være relevant.

Diolia

En healer ble intervjuet i Diolia. Fra tidligere feltarbeid i Diolia er det vist *Syzygium guineense* er en godt kjent plante, og de fleste av de intervjuede healerne brukte *S. guineense*. At denne healeren ikke brukte *S. guineense* i sin praksis er en ren tilfeldighet, vel og merke er han betraktelig yngre enn healere flest, og har kun 3 år erfaring som healer. Som det kom frem i Rusten sin hovedfagsoppgave viste det seg at det lokale navnet på *S. guineense* er *koffing*, det kan være at denne healeren inkludert mange av de tidligere intervjuede healerne bruker *S. guineense*. [1]

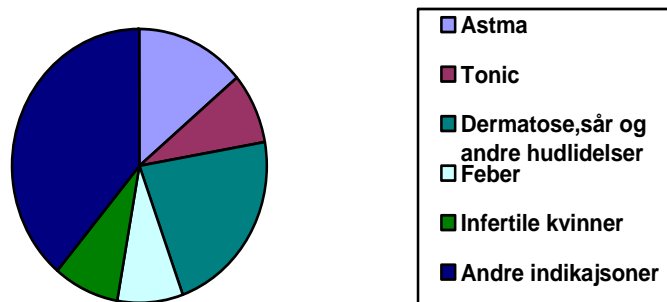
Siby

I tabell 3 vises resultatet fra feltarbeid utført i Siby og landsbyene nær Siby utført i perioden 2-3 desember 2007. 27 healere fra 7 landsbyer ble intervjuet. 11 av de intervjuede healerne var kvinner, som hovedsakelig var spesialiserte healere på barnesykdommer. 23 healere benyttet *S.guineense* i sin praksis til hele 22 ulike indikasjoner. Totalt brukte 16 healere blader, enkelte av disse brukte andre plantedeler i samme preparat.

De 4 healerne som ikke brukte *Syzygium guineense* var kvinner. 2 av disse 4 kvinnene kom i fra Dogoro. En mulig forklaring på dette kan være at Dogoro er en isolert landsby beliggende i høyden. Det kan være at områdene nær Dogoro ikke har de optimale vekstbetingelser for *S. guineense*, noe som gjør at healere fra denne landsbyen må på reisefot for å sanke inn plantemateriale og for å komme i kontakt med healere fra andre medisinske kunnskapstradisjoner. Jeg vil anta at kvinner i Dogoro ikke vil være så mye på reisefot, og at deres kunnskaper og tradisjoner kun er overført i fra mor til barn.

85 % av de intervjuede healerne i Siby brukte *S.guineense*. Figur 14 gir en oversikt over de hyppigst nevnte indikasjoner for *S.guineense*. Astma ble nevnt som indikasjon av 5 healere og er den hyppigste indikasjonen på dette feltarbeidet. Av disse var det 4 kvinnelige healere om brukte *S.guineense* i behandling av Astma hos barn. Astma som indikasjon ble ikke nevnt i de tidligere utførte studier på *S.guineense*, men sammenliknet med de andre feltarbeid ble det i dette tilfellet intervjuet signifikant flere kvinner. Kvinner som behandler for det meste barn, vil dermed behandle typiske barnesykdommer som astma.

25,9 % av healerne brukte *S. guineense* mot dermatose, sår og andre hudlidelser. Kun 2 healere brukte *S. guineense* til sårheling. De typiske hudlidelser går igjen i alle feltarbeid, en grunn til å spekulere i om det kan være noen komponenter i *S. guineense* som påvirker immunforsvaret og som kan fremme en sårheling prosess. Tonic som indikasjon er også hyppig nevnt i alle feltarbeid, det kan være mulig at komponenter i *S. guineense* i en drikk kan styrke immunforsvaret og gi energi. I figur 14 viser den største delen ”andre lidelser” til 14 ulike indikasjoner.

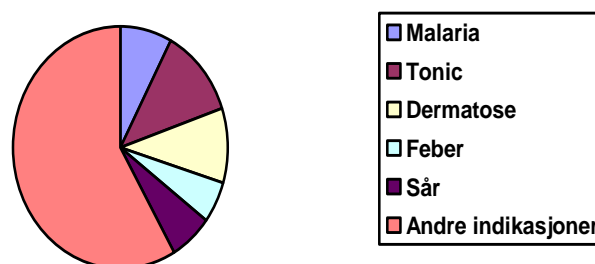
Bruksområder for *Syzygium guineense*

Figur 14: Resultat fra feltarbeid utført i Siby desember 2007

5.10 Sammenlikningsstudie fra feltarbeid utført 2006-2007

Resultat fra alle feltarbeid gir følgende resultater: Totalt 132 healere har blitt intervjuet, av disse var det 78 healere som brukte *S. guineense* til 57 forskjellige indikasjoner. Figur 15 viser til de hyppigst forekommende bruksområdene for *S. guineense* er Dermatose (9), tonic (9), malaria (7), sår (6), astma (5), søvnløshet (5) og feber (5). Resterende indikasjoner(50) utgjør 87,72 %. 16 av 78 healere brukte *S.guineense* til dermatose og sår, dette utgjør 20,5 %.

Resultatene viser til at bruksområdene for *S. guineense* er mange, slik at de blir vanskelig å differensiere mellom dem. Det er ingen spesiell indikasjon som utmerker seg mer andre, men flere av de nevnte indikasjonene er typiske indikasjoner der en i moderne medisin bruker legemidler med effekt på immunforsvaret. Alle intervjuene er utført i flere geografiske og kulturelle områder i Mali, ca 60 % av de intervjuede healerne bruker *S.guineense*, og på tvers av disse områdene ser en visse fellestrekk, som bruk av *S. guineense* til hudlidelser og tonic. En kan konkludere med at *S. guineense* er en godt kjent plante i de områder der de optimale vekstbetingelser er tilstedet, og at en teori om *S. guineense* med sårhelende effekt har utviklet seg til en mulig teoretisk idé om at *S.guineense* kan ha effekt på immunsystemet. Det er gode holdepunkter for at *S. guineense* bør undersøkes for immunologisk aktivitet.

Bruksområder for *Syzygium guineense*

Figur 15: Resultat fra alle feltarbeid utført i 2006-2007. Viser til de hyppigst nevnte indikasjoner

6. Eksperimentelt

6.1 Generelle eksperimentelle metoder

6.1.1 Metoder basert på Absorbansmåling

Fenol svovelsyre testen (Metode 2.3.2.1) 490 nm	BIO-RAD Model 3550 Microplate Reader,
Bestemmelse av protein (Metode 2.3.3.9)	Thermo Spectronic Helius Epsilon Spectrophotometer, 660 nm.
Komplementfikseringstest (Metode 2.3.4.1)	Thermomax microplate reader (Molecular Devices), 405 nm
IR- Spektroskopi (Metode 2.3.3.8)	IR-408 (Shimadzu)
Makrofagaktivitet (Metode 2.3.4.2)	Titertek Multiskan, 540 nm.

6.1.2 Blanding av løsninger

Løsninger ble blandet ved å bruke: Whirlimixer, Minishaker, IKA-Vibrax-VXR

6.1.3 Evakuering av luft i fra løsninger

Luft ble evakuert fra løsninger ved:

1. Fortrening med inerte gasser: Helium, nitrogen og argon
2. Vakuum ved hjelp av vannstrålepumpe

6.1.4 Filtrering

Gasbind:	Kokt 10 minutter i destillert vann for å fjerne cellulose
Glassfiberfilter:	Glasfaser microfibre filter 15 cm (Schleicher & Schüll)
Mikrofilter:	Acro [®] 50A Filter Device 5 µm Versapore [®] Membrane (PALL Gelman Laboratory) Millex [®] HA, 0,45 µm (Millipore), Millex [®] HA, 0,22 µm (Millipore)

6.1.5 Frysetørking

Prøven tørkes ved at vann sublimerer fra prøven under vakuum. Dette gjøres ved å senke trykket, samtidig som temperaturen øker. Prøven må da på forhånd fryses, dette kan gjøres enten i dypfryser

eller ved å rotere prøven i metanolbad nedkjølt til -40°C . Ved å rotere kolbene på metanolbad dannes det en jevn kappe av is i kolben, og sublimeringen vil skje mer effektivt. Løsninger i rundkolber frysetørker utenpå frysetørkeren, mens løsninger i reagensrør dekkes med perforert parafilm og frysetørkes inne i frysetørkeren. Det tar lenger tid å frysetørke inne i frysetørkeren, men dette kan være i enkelte tilfeller nødvendig for forenkling av de videre trinn i en metode. Å dampe inn løsningene på rotavapor før frysetørking er tidsbesparende. En fordel med denne metoden er at behandlingen er skånsom og egnes godt til substanser som er sensitiv for varme.[31]

6.1.6 Innveiging

Avhengig av mengde ble stoffer veid inn på analysevekt eller overskålsvekt.

6.1.7 Sentrifugering

Komplementfikseringstest (Metode 2.3.4.1):

Christ 901

Proteinbestemmelse (Metode 2.3.3.9):

Multifuge 4KR Heareus

6.1.8 Syrevask av glassutstyr

Polysakkarider finnes naturlig over alt, det er viktig at glassutstyr som benyttes ikke er kontaminert med disse. Utstyr er ofte lagret i papp- og papiremballasje som består av cellulose og andre potensielle karbohydratforurensninger, disse kan interferere med analysene og må derfor fjernes før bruk. Ved vasking av glassutstyret i konsentrert saltsyre vil karbohydratforurensninger spaltes og ødelegges, disse fjernes så med grundig skylling med vann, tørkes godt (Varmeskap 80°C) og pakkes inn i aluminiumsfolie slik at glassutstyret ikke blir forurensset..

6.1.9 Volumreduksjon

Med den hensikt å redusere volumet, oppkonsentrere løsninger eller fjerne løsningsmidler og andre uønskede lettflyktige substanser, ble løsninger dampet inn under vakuum ved $30-40^{\circ}\text{C}$ på rotavapor. (Tidsbesparende å bruke pærekolber sammenliknet med rundkolber.)

6.2 Metodeprinsipper

6.2.1 Isolering og oppresning av polysakkaridfraksjoner

Væske-Væske Ekstraksjon

Ekstraksjon er en metode for å separere polare forbindelser fra upolare forbindelser. Væske-væske ekstraksjon baserer seg på forbindelsenes fordeling mellom to ikke-blandbare væsker og ”likt løser likt” prinsippet. Upolare forbindelser vil ekstraheres over i et upolart løsningsmiddel, mens polare forbindelser vil ekstraheres over i polare løsningsmidler. Det blir da viktig å benytte et løsningsmiddel med tilstrekkelig løsemiddelstyrke til å løse de ønskede forbindelsene og med tilstrekkelig selektivitet slik at kun de ønskede forbindelsene blir ekstrahert med.[34]

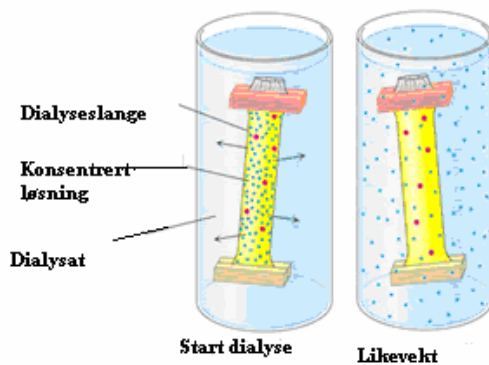
Upolar ekstraksjon av plantematerialet

Ved å starte en ekstraksjon med et upolart løsningsmiddel som diklormetan (DCM) vil de mest upolare forbindelsene ekstraheres over i den organiske fasen. Plantematerialet kan deretter ekstraheres med et litt mer polart løsningsmiddel som metanol (MeOH) slik at forbindelser som er litt mer polare ekstraheres over. Gjentatte ekstraksjoner gir et høyere utbytte enn en enkelt ekstraksjon. Bruk av soxhlet apparat gir en automatisert ekstraksjon med gjentatte ekstraksjoner. Hensikten er å fjerne de lavmolekylære og upolare forbindelsene som kan interferere med polysakkaridanalyser.

Polar ekstraksjon av plantematerialet

Polysakkarider er polare forbindelser og er følgelig løselig i polare løsningsmidler, men løseligheten varierer blant polysakkarider. Løseligheten øker med temperaturen, ved å ekstrahere ved forskjellige temperaturer kan man få forskjellige fraksjoner med hver sin sammensetning av polysakkarider. Ved å ekstrahere materialet ved en bestemt temperatur, vil polysakkarider som løses ved den bestemte temperaturen kunne ekstraheres fra andre komponenter i plantematerialet.

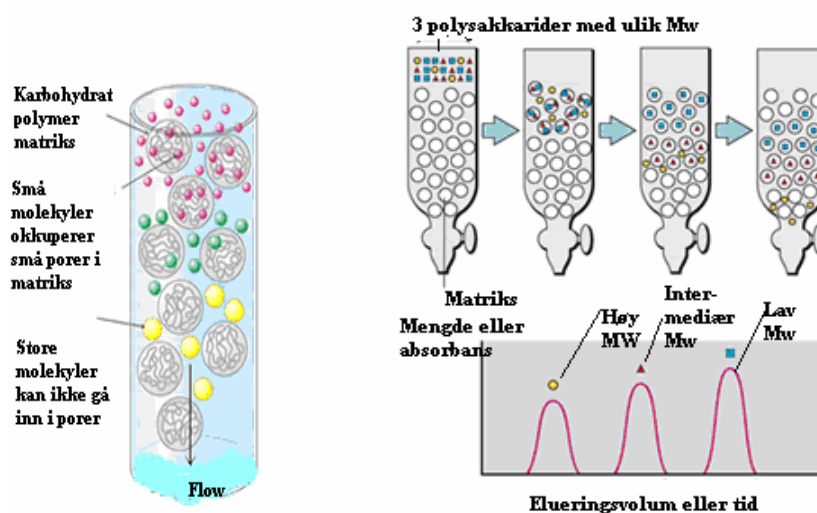
Dialyse



Figur 16: Prinsipp for dialyse

Dialyse er en metode for å separere små og store molekyler i en løsning ved selektiv diffusjon over en semipermeabel membran. Prøveløsningen fylles i en dialyseslange og legges i et begerglass fylt med destillert vann (dialysat). En dialysemembran vil skille prøveløsningen fra dialysatet. Dialysemembranen har en porestørrelse som tillater små molekyler (inkludert salter) til å diffundere over, mens store molekyler blir holdt tilbake. (bestemt av dialyseslangens "membranes molecular weight cutoff" (MWCO). Volumet på dialysatet er 200-300 ganger større enn for prøveløsningen, noe som lager en konsentrasjonsgradient over dialysemembranen. Følgen av dette er at molekyler vil begynne å diffundere over dialysemembranen inntil likevekt oppnås over membranen. (Figur 16) Hastigheten til dialysen vil avta når likevekt nærmer seg, for effektiv dialyse er det dermed viktig å bytte dialysat etter noen timer. Dialysen er mest effektiv under kontinuerlig røring, røring opprettholder konsentrasjonsgradienten og er dermed tidsbesparende for selve dialysen. [35]

Kolonnekromatografiske metoder – Gelfiltrering



Figur 17: Separasjonsprinsipp for gelfiltreringskromatografi.

Generelt prinsipp

Gelfiltrering kromatografi er en metode for å separere molekyler etter molekylstørrelse når de passerer gjennom en porøs gelmatriks. Gelmatriksen pakkes i kolonnen ved at en buffer fyller porene mellom matrikspartiklene. Prøven appliseres på kolonnen og en mobilfase vil dra prøven med seg ned kolonnen. Underveis vil substanser diffundere ut og inn av porene. Lavmolekylære substanser vil diffundere lenger inn i porene og vil følgelig elueres senere enn høymolekylære substanser. Høymolekylære polysakkarider som ikke vil diffundere inn i porene vil elueres med "void volumet". Det betyr at polysakkarider vil elueres etter avtagende molekylstørrelse ved gelfiltrering. Mengde av hver fraksjon som elueres kan måles spektrofotometrisk og plottes mot elueringsvolumet eller med tiden. Spekteret kan brukes til kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av polysakkarider i prøven. (Figur 17). Porestørrelse i gelmatriks kan velges ut fra ønske om en grovseparasjon eller finseparasjon av molekylstørrelser. Grovseparasjon kan benyttes hvis en ønsker rask eliminering av salter og andre lavmolekylære substanser, og er dermed anvendbar for opprensning av prøve. Finseparasjon av molekylstørrelser kan være av ønske for å isolere spesifikke molekylstørrelser, bestemme molekylvekt, studere molekylvektfordeling eller for ytterligere opprensning av polysakkaridfraksjoner i et av de siste isoleringstrinn. Dette bestemmes av gelens definerte fraksjoneringsområde. BIO-GEL[®] P-6 Polyakrylamidgel benyttes til grovseparasjon over et smalt fraksjoneringsområde, Sephacryl-S400 benyttes for separasjon over et bredere fraksjoneringsområde. Der det er ønskelig å eliminere lavmolekylære substanser fra små volum benyttes PD-10 kolonner. For bestemmelse av molekylvekt benyttes en HiLoad 26/60 Superdex 200 kolonne.[36]

BIO-GEL[®] P-6 Polyakrylamidgel

BIO- Gel P-6 DG er en porøs polyakrylamidgel dannet ved kopolymerisering av akrylamid og N, N-metylen-bis-akrylamid. Gelen er svært hydrofil og tilnærmet uten ladning. Bio- Gel P-6 medium består av partikler i størrelsesområde 90-180 µm og egner seg til separasjon av molekyler i fraksjonsområde 1000-6000 Da. Fraksjoneringsområde er smalt og metoden egner seg til grovseparasjon av høymolekylære polysakkarider og lavmolekylære substanser i en prøve. Anbefalt pH område er 2-10 og gelen er temperaturstabil i område 4-80°C[37]

Sephacryl-S400

Sephacryl-S400 HR er en hydrofil gelmatriks bestående av kovalent kryssbundet allyldekstran med N, N-metylen-bisakrylamid. Kryssbinding gir gelen rigiditet og gjør den kjemisk stabil. Hydrofil karakter reduserer uspesifikke adsorpsjoner til gelen og høy mekanisk styrke tillater høy elueringshastighet. Dekstran-komponenten avgjør gelens porøsitet. Sephacryl-S400 HR består av partikler i størrelsesområde 25-75 µm med en gjennomsnittelig partikkelstørrelse på 47 µm.

Sepharyl-S400 er beregnet for separasjon av dekstraner i fraksjoneringsområde 20-8000 kDa, og egnes dermed til finseparasjon av substanser i en prøve der et bredt fraksjoneringsområde er ønskelig. Gelmatriksen har kapasitet til å ta imot 0,5-4 % kolonnevolum prøvemateriale.[38]

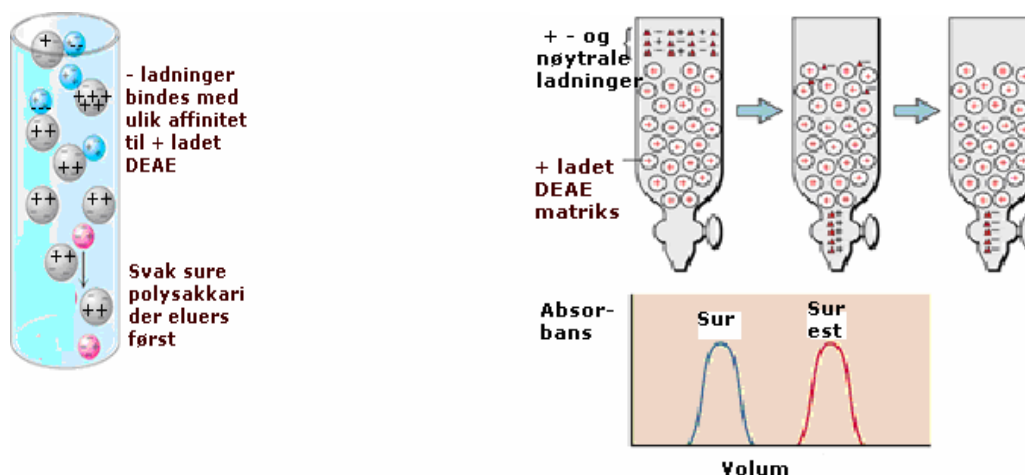
PD- 10 kolonne

PD- 10 kolonnen er en ferdigpakket Sephadex- G-25 medium kolonne bestående av en porøs gelmatriks dannet ved kryssbinding mellom dextran og epiklorhydrin. Sephadex- G-25 medium består av partikler i størrelsesområde 85-260 μm , og er beregnet for separasjon av dekstraner i fraksjoneringsområde 1-5 kDa, dette er et smalt område og Sephadex- G25 matriks egnes dermed til grovseparasjon av høymolekylære substanser fra salter og andre lavmolekylære substanser. Anbefalt pH område er 2-13 og gelen er temperaturstabil i område 4-25°C. Gelfiltrering på PD-10 kolonne er svært enkelt og effektivt, og egnes spesielt godt til desalting av små volum. På en PD-10 kolonne kan 2,5 ml appliseres med et elueringsvolum på 7,5-20 ml.[35]

HiLoad 26/60 Superdex 200 kolonne

Superdex er et porøst gelmedium sammensatt av sterkt kryssbunnende agarose med kovalent bundet dextran. Denne sammensetningen gir gelen høy mekanisk styrke og kjemisk stabilitet. Flow raten kan være høy, og i separasjonen inkluderes en vaskeprosess. Dette er tidsbesvarende, da ny prøve kan raskt appliseres så snart den forrige prøven er eluert. Superdex gelmatriks fås i to ulike partikkelstørrelser (13 μm og 34 μm) og med 4 forskjellige selektiviteter. (Superdex peptid, Superdex 30, Superdex 75 og Superdex 200). Superdex 200 består av partikler med størrelse 13 μm og egner seg til separasjon av molekyler i fraksjonsområde 10-600 kDa. Anbefalt pH område pH 3-12 og gelen er temperaturstabil i område 4-40°C. Gelen egnes til separasjon av små prøvevolum. Som mobilfase brukes 10 mM NaCl løsning. Superdex 200 anbefales hvis molekylstørrelsen er ukjent. For å bestemme molekulvekt lages en standardkurve med dexstranfraksjoner med kjente molekulvekter. Det lages en semilogaritmisk plott som viser til lineær sammenheng mellom logaritmen av molekulvektene og elueringsvolumet.[39]

Kolonnekromatografiske metoder: Ionebytterkromatografi



Figur 18: Separasjonsprinsipp for ionebytterkromatografi

En ionebytter består av et polymert materiale kovalent bundet til en ionisk forbindelse med enten positive eller negative ladde grupper. De ioniske gruppene binder et motjon via elektrostatiske krefter der grad av binding avhenger av prøvens ladning og ladningstetthet. De negative ladde gruppene binder positive ioner (kationbyttere), mens de positive ladde gruppene binder negative ioner(anionbyttere).

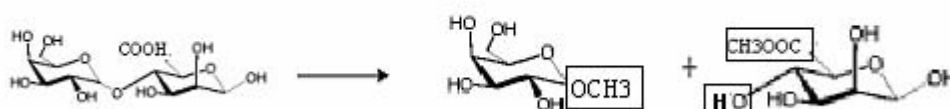
Til separasjon av høymolekylære polysakkarider egnes DEAE sepharose[®] fast flow som ionebytter. Diethylaminoetyl (DEAE) er et kvarternær ammoniumion, og er positivt ladet ved pH-verdier mindre enn ca 10. Ved sure og nøytrale pH verdier fungerer dermed DEAE sepharose[®] fast flow som en svak anionbytter. DEAE sepharose[®] fast flow kolonnen har DEAE bundet til agarose via en eterbinding og har kloridioner som motion. Polysakkarider bindes med større affinitet til DEAE sepharose[®] fast flow enn kloridioner, da de har større molekylvekt og flere ladede grupper per molekyl. Polysakkaridenes affinitet til anionbytteren økes med antall negative ladninger. Nøytrale polysakkarider er uten ladning og har ingen affinitet til stasjonærfasen. (Figur 18) Etter at prøve er påsatt kolonnen kan nøytrale polysakkarider elueres ut ved å bruke destillert vann som elueringsmiddel. De nøytrale polysakkaridene vil gå rett igjennom kolonnen uten forsinkelse, mens de sure polysakkaridene vil bli igjen. Eluering av de sure polysakkaridene kan i prinsippet skje på to måter. Det ene er å senke pH, ved å senke pH vil polysakkaridenes netto negativ ladning minskes og dermed deres affinitet til anionbytteren. Det andre er å øke anionkonsentrasjonen gradvis. Ved å bruke en saltgradient vil polysakkarider med ulik surhetsgrad dissosieres fra DEAE gruppene og elueres fra kolonnen på ulike tidspunkt. Binding til DEAE gruppene er kompetitiv mellom alle negative ladde grupper, det betyr at Cl ioner vil fortrenge de sure polysakkaridene fra DEAE gruppene lineært med økning i Cl konsentrasjonen. De svak sure polysakkaridene vil fortrenses først, deretter vil polysakkarider fortrenses etter økende surhetsgrad. [40,41]

6.2.2 Kvantitative og kvalitative bestemmelser av polysakkaridfraksjoner

Fenolsvovelsyretest

Fenolsvovelsyretesten er en enkel, rask, sensitiv og pålitelig metode for å bestemme karbohydratinnhold i en løsning. Konsentrert svovelsyre spalter polysakkarider i mange monosakkarid enheter. Monosakkarider i reaksjon med fenol danner et gulfarget kompleks. Dette komplekset kan detekteres spektrofotometrisk ved 490 nm.[42]

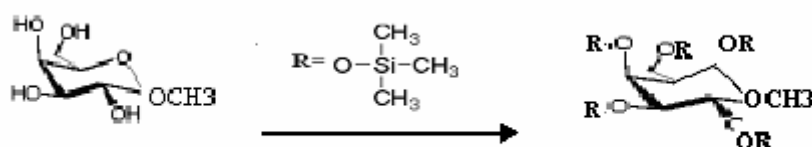
Metanolyse



Figur 19: Metanolyse følger en S_N1 reaksjon

Metanolyse er eksempel på en nukleofil substitusjonsreaksjon (SN1 reaksjon), der nukleofil er del av løsningsmiddelet, i dette tilfellet metanol i HCl. Etter at glykosidbindinger mellom to monosakkarider spaltes i det sure miljøet vil metanol i HCl etterlate seg et karbokation på monosakkarid 1 og et anion på monosakkarid 2. Metanol som nukleofil tiltrekker seg den positive ladningen på monosakkarid 1 og binder seg til. Monosakkarid 2 plukker opp proton fra metanol, slik at det i denne enden dannes en fri hydroksylgruppe mens i den reduserte enden på monosakkarid 1 dannes et metylglykosid. For de sure uronsyrer vil metanol reagere med karboksylsyren og med det bli metylesterfisert. (Figur 19). [43.] Reaksjonen skjer i vannfritt miljø og ved høy temperatur.

TMS derivatisering



Figur 20 TMS derivatisering ved Silylering

Stoffer som skal analyseres ved gasskromatografisk metode må være i gassform, dermed er det bare flyktige og termisk stabile stoffer som kan separeres ved gasskromatografi. Monosakkaridene har mange polare hydroksylgrupper som nedsetter deres flyktighet. I tillegg forårsaker de adsorpsjon til overflater og stoffer elueres som brede toppler med haledannelse. Problemet kan elimineres med derivatisering. Under derivatisering omdannes de polare gruppene til upolare grupper som langt mer flyktige og termisk stabile.

Metylglykosidene derivatiseres ved silylering (figur 20). Til dette brukes et TMS reagens. TMS reagentet består av heksametyldisilazan (HMDS), trimetylsilan (TMCS) og pyridin. Pyridin er løsningsmiddel, mens HMDS og TMCS er silyleringsreagensene. HMDS og TMCS vil erstatte aktive H-atomer i metylglykosidene med en trimetylsilylgruppe. Derivatene som dannes er termisk stabile, flyktige og velegnet for GC. [44]

Gasskromatografi

Gasskromatografisk metode (GC) omfatter både separasjon og måling av gass og flyktige stoffer i løsning. I GC er den mobile fasen en bæregass. Når prøven injiseres vil stoffer raskt bringes i gassform og bæregassen vil bringe stoffene gjennom en kolonne. I kolonnen vil stoffene fordele seg mellom bæregassen og den stasjonære fasen. Stasjonærfasen er en temperaturstabil ikke flyktig væske som ligger som en tynn film på innsiden av kolonnen. Alle stoffer som skal analyseres ved GC må være flyktige og termisk stabile ved de temperaurene som benyttes, temperatur blir derfor den

viktigste parameter i GC. Når flyktigheten er svært varierende blant stoffene er det lurt å separere ved å benytte temperaturprogrammering. I tillegg til temperaturen er retensjonen også styrt av stoffenes løselighet i den stasjonære fasen, samt av sterisk konfigurasjon. Det betyr at et spesifikt stoff i en prøve med sin flyktighet og løselighet i den stasjonære fasen bestemmer hvor lang tid det tar før dette stoffet bæres ut av kolonnen. På utgangen av kolonnen er det en flammeionisasjonsdetektor (FID) som detekterer hvert stoff som kommer ut. Detektoren måler strøm fra ladede partikler som oppstår når organiske stoffer brenner i en flamme. Strømmen er proporsjonal av mengden organisk stoff som brenner. Hvert stoff kommer ut med et signal/topp i kromatogrammet. Stoffets retensjonstid er spesifikt for et stoff og kan brukes til kvalitativ analyse. Arealet under hver topp kan beregnes for kvantitativ bestemmelse. Internstandard må benyttes for å kunne foreta kvantitativ analyse. Dette er stoff som kjemisk likner monosakkaridene og tilsettes prøven. Konsentrasjonen til et stoff måles relativt til internstandarden. Spesielt i gasskromatografi er det meget viktig å benytte intern standard ved kvantifisering fordi det lett mistes stoff når prøven fordampes under injeksjon, samtidig korrigerer den interne standarden for variasjoner under prøveopparbeidelse og under alle trinn i analysen.[45]

Monosakkarider i en prøve vil gi et karakteristisk mønster i GC- kromatogrammet, dette skyldes at det vil innstilles en likevekt mellom monosakkaridenes furanose og pyranose form, α og β konfigurasjon, lineær struktur og ringform Hvert monosakkarid vil ha en relativ retensjonstid i forhold til en intern standard med kjent retensjonstid, og dette brukes til identifikasjon av monosakkaridene. Forholdet mellom topparealet til et monosakkarid og intern standard beregnes for å bestemme mengde av hvert monosakkarid i prøven.

6.2.3 Metoder for strukturanalyser av polysakkaridfraksjoner

Karboksylysrereduksjon før metylering

I pektinmolekylet vil noen av uronsyrene være metylesterfisert, mens andre uronsyrer vil være frie. Før metylering må metylesterfiserte uronsyrer og de frie uronsyrer reduseres til deres nøytrale sukker galaktose. Metylesterfiserte uronsyrer reduseres direkte til 6,6 dideuterium-sukker med $\text{NaBH}_4/\text{NaBD}_4$ under basekatalyse. Karboksylysrer vil ikke la seg redusere direkte med $\text{NaBH}_4/\text{NaBD}_4$, og et basisk miljø vil lett føre til β -eliminering. Karboksylysrer må derfor først aktiveres med carbodiimid, før reduksjon med $\text{NaBH}_4/\text{NaBD}_4$. Ved å utføre en reduksjon av nativt metylesterfisert uronsyre og frie uronsyrer over selektive reduksjonstrinn, er det mulig å skille de frie uronsyrer fra de metylesterfiserte ved bruk av GC/MS, og disse kan kvantitativt bestemmes. Denne metoden vil ikke kunne kvantifiserte mengde metylesterfisert uronsyre, for bestemmelse av det er en teoretisk metode foreslått. 3 metoder med selektive reduksjonstrinn vil forsøkes.[46]

Metode med selektiv reduksjon for bestemmelse av total mengde uronsyre

Selektiv reduksjon utføres ved å redusere i ett trinn. Etter aktivering med Carbodiimid reduseres det med NaBD_4 . Summen av mengde GalA og MeGalA i prøven kan bestemmes ved bruk av GC/MS. Deuteriummerket galaktose skilles i fra umerket galaktose, da de vil ha et primærfragment med masse M+2 i massekromatogrammet.

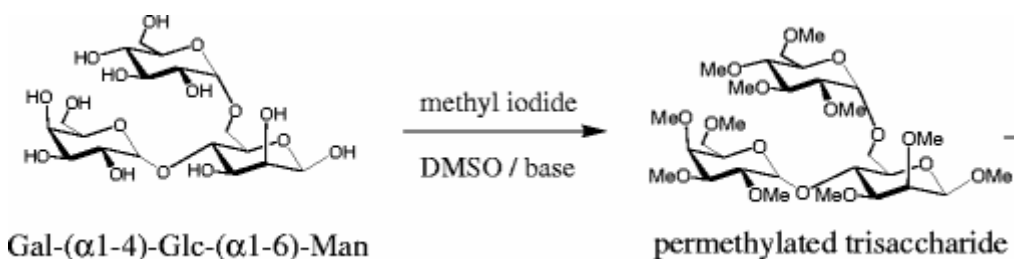
Metode med selektiv reduksjon for bestemmelse av mengde uronsyre

Selektiv reduksjon utføres over to trinn, henholdsvis før og etter aktivering med carbodiimid. Uttak 1 reduseres med NaBD_4 i første trinn og med NaBD_4 i andre trinn, mens uttak 2 aktiveres med NaBH_4 i første trinn og med NaBD_4 i andre trinn. For uttak 1 kan summen av mengde GalA og MeGalA bestemmes, mens for uttak 2 kan mengde GalA bestemmes. Deuteriummerket galaktose skilles i fra umerket galaktose, da de vil ha et primærfragment med masse M+2 i massekromatogrammet.

Teoretisk metode med selektiv reduksjon for bestemmelse av nativt metylforestrede galakturonsyre

En teoretisk metode er foreslått for bestemmelse av MeGalA. Selektiv reduksjon utføres over to trinn, henholdsvis før og etter aktivering med carbodiimid. Før aktivering med carbodiimid reduseres alle prøvene med NaBD_4 , slik at kun de nativt metylesterfiserte uronsyrer reduseres og deuterium merkes. Etter aktivering deles prøvene i to uttak. Uttak 1 reduseres med NaBH_4 slik at mengde MeGalA kan bestemmes, mens uttak 2 reduseres med NaBD_4 slik at summen av mengde GalA og MeGalA bestemmes. Deuteriummerket galaktose skilles i fra umerket galaktose, da de vil ha et primærfragment med masse M+2 i massekromatogrammet. [32,46]

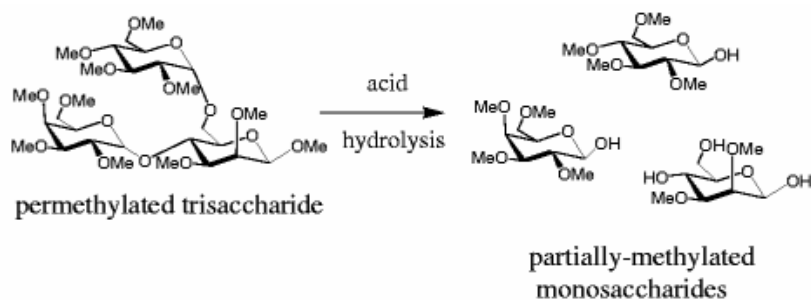
Metylering



Figur 21: Basekatalysert metylering av hydroksylgrupper [49]

I sin natur er monosakkaridenhetene et stort polyhydroksy molekyl, noe som gjør de svært hydrofil. Ved metylering konverteres alle de frie hydroksylgrupper til metoksidgrupper, og med det danner en hydrofob poly-metyl-eter forbindelse.(Figur 21)[46]. Metyleringsreaksjonen er en SN-2 reaksjon (substitusjon nukleofil bimolekylær reaksjon), og følger Williamsom eter syntese.[47]. Metyljodid egner seg godt som elektrofil, den har ingen sterisk hinder for et nukleofilt angrep og jod er en god forlatende gruppe. Polysakkaridene har mange nukleofile oksygenatomer og kan fint reagere med metyljodid, men uten basekatalyse vil reaksjonen gå tregt. Basen plukker opp et proton på hydroksylgruppa og danner et metoksid-ion, og med det gir en mer reaktiv nukleofil. Metoksid-ion reagerer med metyljodid i et enkelt trinn, der metylgruppa plukkes opp, mens jod forlates som et stabilt anion.[48]. DMSO er et kationsolvatiserende løsningsmiddel, det betyr at løsningsmiddelet ikke vil binde seg til anioner, og med det lager fri bane for et nukleofilt angrep, reaksjonshastigheten øker betraktelig. Da reaksjonen er svært sårbar for vann, vil et vannfritt løsningsmiddel som DMSO i tillegg være et godt valg.[47].

Hydrolyse



Figur 22: Syrekatalysert hydrolyse av polysakkarider [49]

Etter dannelse av poly-metyl-eter følger syrekatalysert hydrolyse. Alle glykosidbindingene kløyves, mens metyl-eter bindingene holdes inntakt. (Figur 22) TFA er en organisk syre og vil kunne løse de metylerte polymerene. TFA er flyktig og kan lett dampes av under nitrogenstrøm etter at alle glykosidbindingene er spaltet. Avdamping med nitrogengass kan også forhindre uønskede reaksjoner, som oksidasjon. [46]

Reduksjon

De hydrolyserte monosakkarider reduseres til alditol med NaBD_4 og basekatalyse. Ringstrukturen åpnes og aldehydgruppen på C1 reduseres til sin primære alkohol. Hydroksylgruppen blir Deuteriummerket, slik at de reduserte monosakkaridene kan identifiseres ved GC/MS. [46].

Acetylering

De frie hydroksylgrupper dannet etter reduksjon acetyleres med edikksyreanhydrid, slik at de reduserte monosakkaridene blir upolare og flyktige forbindelser. Acetylgrupper innføres på de karbonatomer der glykosidbindingene har vært før kløyving. Monosakkaridene kan etter acetylering analyseres ved GC-MS som delvis metylerte alditol-acetater, og bindingsforhold i molekylet kan bestemmes. [46]

GC-MS

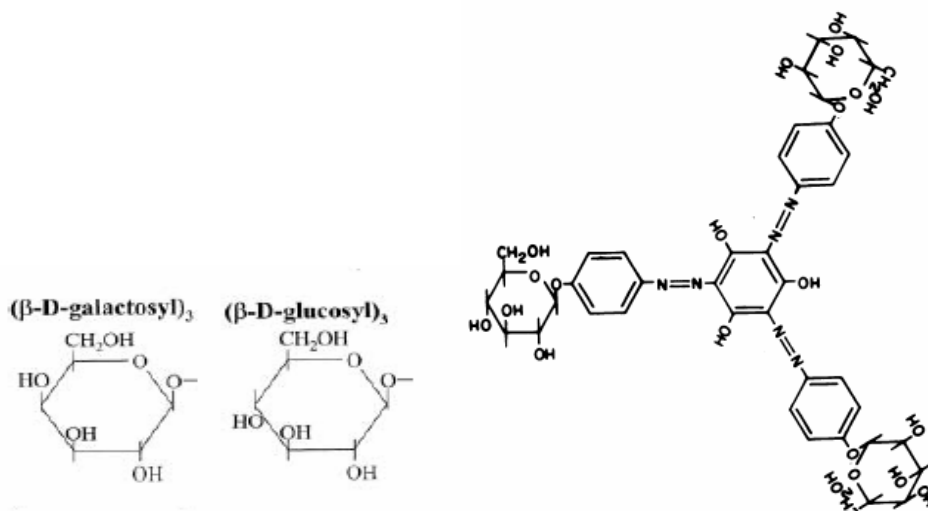
GC/MS er en svært følsom separasjonsmetode der komponenter i en prøve først separeres ved bruk av gasskromatografi for å så detekteres i et massespektrometer. Inne i massespektrometeret bringes små mengder prøve i gassform før de under vakuum bombarderes med en strøm av høyenergiske elektroner. Et valenselektron fra molekylene i prøven blir slått ut, slik at det dannes kation-radikaler/molekylioner. Molekylionene får tilført mye energi under elektron- bombarderingen, det gjør de ustabile og de vil lett fragmenteres. Noen av disse fragmentene vil fortsatt ha en positiv ladning, mens andre er nøytrale. Positive ioner får tilført kinetisk energi som fører til defleksjon (avbøying) i et magnetfelt. Grad av defleksjon avhenger av molekylets masse/ladning (m/z)- ratio. De ladede molekylene vil i enden av massespektrometeret treffe en detektor som registrerer intensiteten til ionene som funksjon av deres m/z . Fragmenteringsmønsteret som vises i massekromatogrammet er helt unikt for alle molekyler, det blir som et fingeravtrykk for molekylet. Dette er en stor fordel ved bruk av massespektrometri, fordi det gjør det mulig å skille molekyler fra hverandre, også molekyler med samme molekylvekt men med ulik sammensetning. Ved å se på retensjonstiden til de delvis metylerte alditol-acetatene i GC, og masse og fragmenteringsmønster i MS, kan de delvis metylerte alditol-acetatene kvalitativt og kvantitativt bestemmes. Da C1 i alle de delvis metylerte alditol acetatene er Deuteriummerket kan dette gi informasjon om bindingsforholdene til monosakkaridene i prøven.[49]

GC-MS analysen ble utført ved avdeling H, Farmasøytisk institutt, under av Finn Tønnesen.

Svak syre hydrolyse

Arabinose på furanoseform er mindre syrestabil enn arabinose på pyranoseform og kan avspaltes selektivt fra polysakkarider ved svakt sure betingelser. Reaksjonen følger en SN_1 reaksjon og resulterer i en polysakkaridstruktur der Araf er avspaltet. Araf kan separeres fra den modifiserte polysakkaridstrukturen ved dialyse eller bruk av PD-10 kolonne, ved bruk av PD-10 kolonne vil Araf havne i den lavmolekylære fraksjonen og følgelig separeres fra den høymolekylære modifiserte polysakkaridstrukturen. For å finne ut forholdet mellom Araf og Arap i den opprinnelige strukturen kan monosakkaridsammensetningen bestemmes i den modifiserte polysakkaridstrukturen ved metanolyse og GC/MS og sammenliknes med den opprinnelige.[50]

Felling av AG-II med Yariv antigen



Figur 23: Kjemisk formel for Yariv antigen og terminal sukker β -D-glukosyl eller β -D-galaktosyl. [20,51].

Yariv antigen er fenylazoglykosider med den generelle formelen (figur 23).[51]

I reaksjon med Arabinogalaktan-proteiner (AGP) dannes det et rødbrunt presipitat. Presipitatet kan brukes til kvalitativ og kvantitativt bestemmelse av AGP. Yariv reagens har også blitt mye brukt for bestemmelse av cellulære og molekylære funksjoner av AGP. Det er vist at endesukkeret på Yariv antigen er essensiell for binding til AGP, terminalsukkeret må være en β -D-glukosyl for dannelsen av presipitat med AGP. Som positiv kontroll i testen brukes arabisk gummi (*gummi arabicum*) [20,51].

Bestemmelse av native estergrupper i polysakkarider ved IR-spektroskopi

IR spektroskopi er en rask og enkel metode som baserer seg på det faktum at stoffer kan absorbere energi i form av elektromagnetisk stråling. I IR spektroskopi benyttes elektromagnetisk stråling i bølglengdeområde 600- 15000 nm, dette tilsvarer bølgetall mellom 4000 og 670 cm^{-1} . IR stråling sendes gjennom en KBr tablett av analytt og transmittans registreres som funksjon av bølgetall i IR spekteret. Ved de høyeste bølgetall (1200-3600 cm^{-1}) i IR spekteret får en mye informasjon om funksjonelle grupper og kjemiske bindinger i et molekyl. Ved de høyeste bølgetall elektromagnetisk stråling med lav energi mot analytt. Atomene mellom funksjonelle grupper i analytt er i konstant vibrerende bevegelse, vibrasjonsenergien er avhengig av hva slags binding der er mellom atomene og massen til de individuelle atomene. Ved opptak av IR spektra vil en interaksjon skje når IR-strålingens energi er lik den energien som er forbundet med en bestemt vibrasjon. Dette vises som klare bånd i spekteret. På den måten kan IR- spektroskopi brukes til identifikasjon funksjonelle grupper i et molekyl. Når bølglengden reduseres, vil strålingen ha mer energi, og spekteret vil få mange tette absorpsjonsbånd. Her er det umulig og lese av hva som har absorbert hva. Derfor brukes denne delen av spekteret til "fingerprint"-identifikasjon.(600-1200 cm^{-1}). Denne delen av spekteret vil være svært detaljert, og være unik for hvert stoff. Derfor ved tilgang til et referansespektrum, kan

analytten identifiseres. Når referansespektrum ikke er tilgjengelig kan IR kun benyttes til identifikasjon av funksjonelle grupper. De native estergrupper som her skal undersøkes for vil ha karakteristiske absorpsjonsbånd i IR spekteret ved ca 1750 og 1300 cm^{-1} . [52]

Proteinbestemmelse ved bruk av LOWRY-test

Lowry test er en fargereaksjon over to trinn, samt en kolorimetrisk metode for bestemmelse av protein. I trinn 1 vil divalente kobberioner i basisk miljø danne et kompleks med både peptidbindinger (Biuret reaksjon) og med aromatiske aminosyrer, primært er dette tryptofan og tyrosin. Divalente kobberioner vil reduseres til monovalente kobberioner. Ca^{+} vil katalysere reaksjonen i trinn 2, der Folin-fenol reagens bestående av en blanding av fosfomolybden- wolfram syrer inngår i en redoksreaksjon med de aromatiske aminosyrene. Aminosyrene vil oksideres mens folin-fenol reagentet reduseres. En blå farge indikerer at reaksjonen er funnet sted og absorbans måles spektrofotometrisk ved 660 nm.

Ved bruk av en standardkurve med kjente konsentrasjoner av bovint serumalbumin (BSA) estimeres mengde protein i prøven. Lowry test er svært sensitiv og enkel metode å utføre, men vil lett feiles med tilstedeværelse av en del forbindelser som kan interferere med metoden. Mange av disse er lavmolekylære forbindelser som i prinsippet kan elimineres ved dialyse eller gelfiltrering, men problemet løses best med proteinfelling ved bruk av trikloreddiksyre og Na- deoxykolat. Fargens intensitet er ikke konstant for alle typer proteiner og proteinblandinger, standardens fargeintensitet kan dermed ikke brukes til sammenlikning med prøvens fargeintensitet. Standardkurven basert på BSA vil dermed kun gi en tilnærmet bestemmelse av proteininnhold i prøven. [53,54]

Aminosyreanalyse ved gassfasehydrolyse

Aminosyreanalyse er en kolorimetrisk metode for bestemmelse av aminosyrer i en prøve. Peptidbinder spaltes ved gassfasehydrolyse, de forskjellige aminosyrene separeres ved kromatografi og absorbans måles ved 570 nm og 440 nm. 570 nm brukes til kvantitativ bestemmelse, med unntak av Prolin der 440 nm benyttes. Ved gassfasehydrolyse vil Cystein og Tryptofan nedbrytes, slik at disse kan ikke detekteres. Serin og Tyrosin er ustabile og vil redusert utbytte, typisk 70-80 %, men det hender at Tyrosin brytes ned.

Aminosyreanalysen ble utført av Ola Rumorh Blikrud, Forskningsparken

6.2.4 Metoder for måling av biologisk aktivitet

Komplementfikseringstesten

Komplementfikseringstesten er en immunologisk metode som lenge har blitt brukt i diagnose for påvisning av antistoff i humant serum. Komplementfikseringstesten kan også benyttes til å undersøke om en substans kan påvirke komplement. Da komplementsystemet er under streng kontroll av endogene anti-komplementære substanser er det også teoretisk mulig at eksogene substanser kan ha anti- komplementær aktivitet. Som mål for antikomplementær effekt måles reduksjon av hemolysegrad. Redusert hemolyse kan bety at testsubstans har forbrukt komplement eller bundet til seg komplement slik at disse hemmes eller inaktiveres. Det betyr at komplementfikseringstesten kan gi svar på om plantekomponenter påvirker komplementsystemet, men ikke på hvilken måte. Komplementfikseringstesten består av røde blodceller fra sau, antistoffer mot de røde blodcellene fra kanin, komplement fra humant serum og testsubstansen. Røde blodceller fra sau vil binde antistoff fra kanin og med det danne et immunkompleks. Et immunkompleks er substrat for komplement, binding vil trigge kaskaden og kaskaden ender med et MAC kompleks som lager porer i cellemembranen slik at cellen lyserer. Har polysakkaridene anti-komplementær vil hemolysegrad reduseres. Reduksjon i hemolysegrad måles spektrofotometrisk. Lav absorbans betyr redusert hemolyse og anti-komplementær effekt. Antikomplementær effekt kan regnes ut fra følgende formel:

$$\text{Anti- komplementær effekt} = [(Abs_{\text{kontroll}} - Abs_{\text{prøve}}) / Abs_{\text{kontroll}}] \times 100 \, \%.$$

Hvor mye komplementet alene vil lysere blodcellene betegnes som lyseringsgrad. Anbefalt lyseringsgrad er 50 %. Lyseringsgrad kan regnes ut fra følgende formel:

$$\text{Lyseringsgrad} = Abs_{\text{kontroll}} / Abs_{\text{dest.vann}} \times 100 \, \%.$$

En renset pektin fraksjon (PMII) fra groblad (*Plantago major*) har vist komplementfikserende effekt både på den klassiske og den alternative komplementaktiveringsvei. PMII brukes som positiv kontroll i testen. [22,55]

Måling av NO- frigjøring fra makrofag: Griess reaksjon

Når en makrofag støter på et fremmed antigen i vevet vil de begynne å skille ut immunologiske mediatorer, deriblant NO. Bestemmelse av NO in vitro kan være en indikasjon på at makrofag er aktivert. NO kan bestemmes ved å måle nitritt (NO_2^-), som er et av de to stabile og ikke- flyktige nedbrytningsproduktene av NO.

Griess reaksjon er en kjemisk fargereaksjon over to trinn og en kolorimetrisk metode for bestemmelse av nitritt i en prøve. Griess reagenset består av N-1-naptyletylendiamin dihydroklorid (NED) og sulfanilamid i fosforsyre. Først reduseres sulfanilamid NO_2^- , deretter vil sulfanilamid kation reagerer med NED slik at det dannes en Azo forbindelse med en karakteristisk rød-rosa farge. Absorbans måles spektrofotometrisk ved 540 nm. Ved bruk av en standardkurve med kjente konsentrasjoner av nititt estimeres mengde nitritt i prøven. Griess reaksjon kan detektere NO_2^- i varierte biologiske og eksperimentelle matrikser, som serum, plasma, urin og kulturmedium. Nedre deteksjonsgrense er 2,5 μM nitritt i deionisert destillert vann. [54]

6.3 Eksperimentell utførelse

6.3.1 Ekstraksjon av plantematerialet

Ekstraksjon med upolart løsningsmiddel

Reagenser	Utstyr
1. Diklormetan	1. Varmemantel
2. Metanol	2. Rundkolbe
	3. Soxhletkolonne tilkoblet kjøler
	4. Soxhletfilter

Eksperimentell utførelse

Et soxhletfilter ble fylt med plantematerialet og et glassfiberfilter ble lagt på toppen. Rundkolben ble fylt med ca 3 liter DCM. Plantematerialet ble så ekstrahert til ekstraktet var nesten fargeløst.(3 dager). Etter ekstraksjon med DCM ble samme plantematerialet ekstrahert med metanol på samme måte inntil ekstraktet var nesten fargeløst (3 dager). Plantematerialet ble tatt ut av soxhletfilteret og lagt til tørking på aluminiumsfolie ved romtemperatur. Tørket plantematerielt ble veid.

Ekstraksjon med polart løsningsmiddel

Reagenser	Utstyr
1. Destillert vann	1. Varmeplate med magnetrører
	2. Begerglass
	3. Termometer
	4. Gasbind
	5. Glassfiberfilter
	6. Nutsj og vannstråleakuum

Eksperimentell utførelse

Tørket plantematerialet ble delt i 2 porsjoner med omtrent lik masse. Hver porsjon ble overført til hvert sitt begerglass og destillert vann ble tilsatt (ca 10 ml/g). Plantematerialet ble så ekstrahert ved 50° C i 2 timer. Blandingen ble filtrert gjennom gasbind, deretter gjennom glassfiberfilter ved hjelp av nutsj og vannsug. Ekstraktene fra porsjon 1 og porsjon 2 ble slått sammen. 9/10 av vannekstraktet ble dampet inn på rotavapor.(Metode 6.1.9)

6.3.2 Kolonnekromatografisk separasjon av planteekstrakter

Gelfiltrering ved bruk av BIO-GEL® P-6 Polyakrylamidgel

Reagenser	Utstyr
1. Destillert vann	1. Kolonne: Pharmacia (1060 ml)
2. NaCl	2. Pumpe: Pump P-1 (Pharmacia biotech)
3. BIO- Gel P-6 DG Matriks (90-180 µm)	3. Fraksjonssamler: Fraction collector Superfrac (Amersham biosciences)
	4. Filter: Acro® 50A Filter Device with 5 µm Versapore® Membrane (PALL Gelman Laboratory)
	5. Sprøyte: BD Plastic (10 ml)

Eksperimentell utførelse

Pakking av kolonnen

Hydrert, degasset og redispergert kolonnematerialet ble overført til kolonnen ved å helle langs en glasstav for å hindre dannelse av luftlommer i gelmatriksen. 2 kolonnevolum med destillert vann ble pumpet gjennom kolonnen over natten for å pakke kolonnematerialet.

Vask og regenerering av kolonnen

Gjenværende stoff på kolonnen ble vasket ut før påsetting av nye prøver. Det mest fargede kolonnematerialet på toppen av gelmatriksen ble fjernet før kolonna ble snudd 180° og vasket med 2 kolonnevolum 10 Mm NaCl. Tilsvarende mengde fjernet kolonnematerialet ble erstattet av nytt kolonnematerialet. Resterende ble satt i 0,02 % NaN₃ ved 4°C.

Applisering og eluering

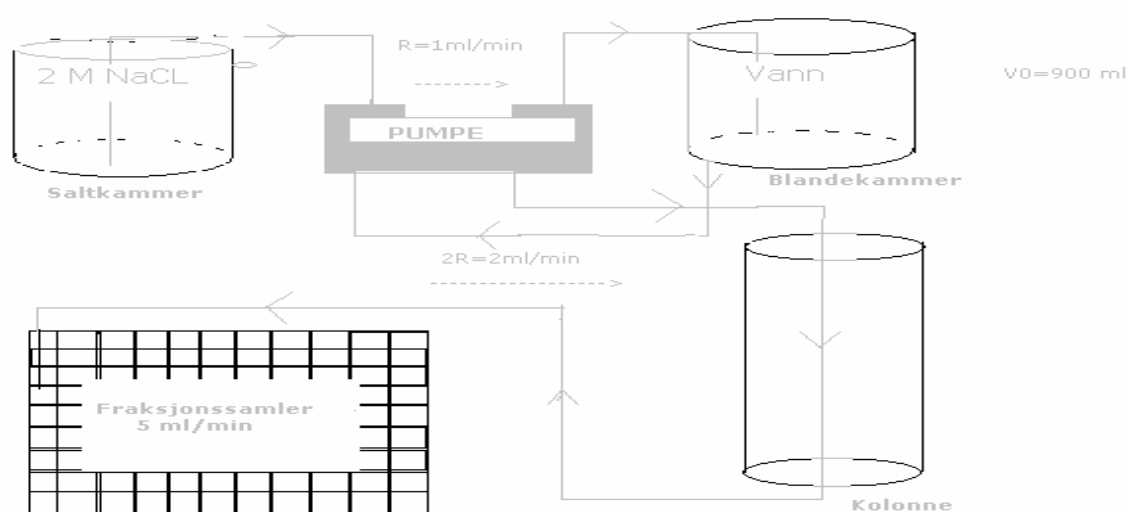
Vannekstraktet ble filtrert 0,5 µm og 100 ml filtrat ble applisert på kolonna med hastighet 2 ml/min. Fraksjoner på 10 eller 15 ml ble samlet i totalt 180 rør. Fenol svovelsyre test ble utført på fraksjonene for å måle karbohydratinnhold og for undersøkelse av elueringsprofil. På bakgrunn av Fenol svovelsyre testen ble alle høymolekylære polysakkarider slått sammen. Dette gav en fraksjonene H.

Ionebytterkromatografi

Reagenser	Utstyr
1. Destillert vann	1. Kolonne: Pharmacia (600 ml)
2. 2, 2 M NaCl	2. Pump P-1 (Pharmacia biotech)
3. 0,5M NaOH	3. Perimax Spetec (Holger teknologi)
4. 0,05 % NaN ₃	4. Fraksjonssamler: Superfrac (Amersham bioscience)
5. Mettet AgNO ₃ løsning (pH=3)	5. Oppsamlingsrør: Sentrifugerør, 15 ml (Heger AS)
6. Matriks: DEAE sepharose [®] fast flow (45-165 µm)	6. Filter: Acro [®] 50A Filter Device with 50 µm
	7. Sprøyte: BD Plastic (10 ml)
	8. Glassstav

Eksperimentell utførelse

Kolonnen ble mettet med Cl⁻ ioner ved å eluere 2 kolonnevolum med 2M NaCl. Overflødige kloridioner ble fjernet ved å vaske kolonnen med destillert vann inntil 2 ml eluat ikke ble blakket med 1 dråpe mettet AgNO₃ løsning. Fraksjon H ble filtrert gjennom 0,5 µm filter og 500 ml filtrat ble applisert på kolonna med hastighet 2 ml/min. Nøytrale polysakkarider ble eluert med ca 2 kolonnevolum destillert vann ved hastighet 2 ml/min, eluatet ble kastet. Sure polysakkarider ble så eluert ut med NaCl gradient (0-2,0M) i 15 timer. Oppsett for eluering med NaCl gradient vises i figur 1. 180 fraksjoner ble samlet opp på fraksjonssamler. (10 ml per fraksjon). Fenol svovelsyre test ble utført på fraksjonene for å måle karbohydratinnhold og for undersøkelse av elueringsprofil. Fraksjoner ble delt inn etter elueringsprofil, dette gav fraksjonene HSUR1 og HSUR2. Begge fraksjoner ble dampet inn (metode 6.1.9), dialysert (6.3.3) og deretter frysetørket (metode 6.1.5).



Figur 24 Oppsett for eluering med NaCl gradient

Volum i blandekaret ble beregnet til å være 900 ml. Et overskudd på 200 ml ble tilsatt for å forhindre at blandekaret skulle gå tomt. Dette overskuddet ble tatt hensyn for og startkonsentrasjonen i saltkammeret ble økt i forhold til denne volumøkningen. For å beregne mengde vann i blandekaret ved tiden 0 ble følgende likning benyttet:

$$C/T = (C_0 * R) / V_0$$

C= Konsentrasjon NaCl ved tiden T

T= Hvor lang tid forsøket tar

C₀= Startkonsentrasjonen av NaCl i saltløsningen

R= Flowhastigheten fra saltløsning til blandekar

V₀= Mengde vann i blandekaret ved T=0

Vasking og regenerering av kolonnen

Kolonnen ble snudd 180° og 2 kolonnevolum 0,5M NaOH ble eluert. (Kun før første applisering av prøve, da kolonnen var noe uren), deretter ble 2 kolonnevolum 2M NaCl eluert. Kolonnen ble så vasket med destillert vann inntil 2 ml eluat ikke ble blakket med 1 dråpe mettet AgNO₃ løsning. Overflødige kloridioner er da fjernet. Etter siste separasjon ble kolonnematerialet satt i 0,05 % NaN₃-løsning og lagret ved 4°C

Gelfiltrering ved bruk av Sephacryl-S400 kolonne

Reagenser	Utstyr
1. Destillert vann 2. NaCl 3. Sephacryl-S400 HR (25-75µm)	1. Kolonne: XK 26 (Amersham Biosciences), (500ml) 2. Pumpe: Pump P-1 (Pharmacia biotech) 3. Fraksjonssamler: Fraksjonssamler: Superfrac (Amersham bioscience) 4. Oppsamlingsrør: Sentrifugerør, 7ml (Heger AS) 5. Filter: Millex [®] HA, 0,45 µm (Millipore) 6. Plastsprøyte: 10 ml (Terumo)

Eksperimentell utførelse

Før separasjon ble kolonnen skylt gjennom med 1,5 kolonnevolum degasset destillert vann. Fraksjon HSUR1 oppnådd ved separasjon på DEAE-Sepharose Fast Flow kolonne ble løst i elueringsmiddelet, 10 ml destillert vann, til en konsentrasjon 6 mg/ml, filtrert 0,45 µm, applisert på kolonna og eluert med degasset destillert vann ved 0,5 ml/min. Fraksjoner på ca 3 ml ble samlet opp. Fenol svovelsyre test ble utført på fraksjonene for å måle karbohydratinnhold og for bestemmelse av elueringsprofil. Fraksjoner ble delt inn etter elueringsprofil, dette gav fraksjonene HSUR1A og HSUR1B. Begge fraksjoner ble dampet inn (metode 6.1.9) og frysetørket for videre analyse (metode 6.1.5)

HiLoad 26/60 Superdex 200 kolonne

Reagenser	Utstyr
1. 10 mM NaCl (Mobil fase) 2. 26/60 Superdex 200 (13 µm) 3. Dextran standarder: Dextran T250 (Lot 8374): 123 kDa Dextran B512 (Dex 40 T 8630 Fr 7): 19 kDa Dextran B512 (Fraction 11640-II-IX): 2 kDa	1. Kolonne: HiLoad 26/60 Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech) 2. Fraksjonssamler: Frac-900 (Amersham Pharmacia Biotech) 3. Dataprogram: UNICORN V4.00.16 ? 4. Monitor: UPC 900 5. Injektor: P-920 Valve InV-907 6. Oppsamlingsrør: Sentrifugerør, 7ml (Heger AS) 7. Skriver: Hpdeskjet 980 cxi, professional series 8. Filter: Millex® HA, 0,22 µm (Millipore) 9. Sprøyte: 1ml (BD)

Eksperimentell utførelse

3 mg prøve ble løst i 1 ml mobil fase, 1 ml/min. 1 ml prøve ble filtrert 0,22 µm og injisert. Prøven ble eluert med degasset mobilfase, 10 mM NaCl, ved 1 ml/ min. 96 fraksjoner ble samlet opp på fraksjonssamler, 5,1 ml per fraksjon. Et volum-intervall der prøvens polysakkarider ble eluert ble bestemt, og molekylvektfordelingen ble bestemt ved bruk av dextran standardkurven.

6.3.3 Desalting av planteekstrakter

Dialyse

Reagenser	Utstyr
Destillert vann	Dialyseklemmer
Tolulen	Magnetrører og magnet
AgNO ₃ -løsning	Dialyseslanger: Spectra/por®3, MWCO 3500 Da, = 299 med mer Begerglass

Eksperimentell utførelse

Vasking av dialyseslanger før bruk

Slangene ble klippet opp i passende lengder (60-80cm), og skylt godt i springvann. Slangene ble vasket over to vasketrinn. Først ble slangene kokt 10 min i 2 % NaOH-løsning før de ble skylt godt utvendig og innvendig, først med springvann deretter med destillert vann. Slangene ble så kokt i 10 min i destillert vann, før de ble skylt godt i destillert vann. Inntil bruk ble slangene oppbevart i 0,05 % NaN₃-løsning ved 4°C for å hindre bakterievekst.

Dialyse

Dialyseslangene ble lukket i den ene enden med klemme og fylt med litt destillert vann for å kontrollere at den var tett. Slangene ble så fylt 2/3 fulle med prøveløsning og 5 dråper toluen ble tilsatt for konservering. Luft ble fjernet og slangene ble lukket i den andre enden med klype eller ved å lage en knute. Slangene ble så overført til et stort begerglass med destillert vann og dialysert over noen døgn under omrøring med magnet. Glassstaver ble brukt for å forhindre at magnet kom i kontakt med dialyseslangene. Når 2 ml vann fra begerglasset ikke lenger ble blakket av en dråpe AgNO₃-løsning ble dialysen avsluttet.

PD-10 kolonne

Reagenser	Utstyr
<ol style="list-style-type: none"> 1. Destillert vann 2. NaN_3 (aq) 3. Matriks: SephadexTM G-25 	<ol style="list-style-type: none"> 1. PD-10 kolonne (Amersham Pharmacia Biotech), 9 ml 2. Oppsamlingsrør: Glassrør, ca 7 ml 3. Begerglass 4. Stativ

Eksperimentell utførelse

Kolonnen ble vasket med 25 ml vann før 2,5 ml prøveløsning ble applisert på kolonnen. Eluatet ble kastet. Fraksjoner på 1 ml ble samlet i totalt 6 rør. Fraksjoner som viser til karbohydratinnhold ble slått sammen og frysetørket. Etter siste applisering ble kolonnen vasket med 25 ml vann og konserverert med 0,05 % NaN_3 (aq) ved 4°C.

6.3.4 Kvantitative og kvalitative bestemmelser av polysakkaridfraksjoner**Metanolyse**

Reagenser	Utstyr
<ol style="list-style-type: none"> 1. Mannitol 2. 0,5 M HCl i metanol 3. 1 M HCl i metanol 4. 4 M HCl i metanol 5. Vannfri metanol 6. Pyridin 7. Ediksyreanhydrid 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Supelcorør (4 ml) med teflonbelagt (PTFE/liner) skrukork (Supelco) 2. Brand Transferpettor 50-100 μl (Displacement Micropipette) 3. SMI Capillaries (blå) 4. 2 ml glasspipette med peleusballong 5. P_2O_5-evakuert vakuumsikator 6. Varmeskap 7. Varmeenhet for tørking under N_2-strøm: Reacti-Therm, III Heating Module (Pierce) 8. Oppsett til tørking med N_2-gass. 9. Verneutstyr: Hansker og briller

Eksperimentell utførelse

Tilstandgjøring av indrestandard

50g mannitol ble veid ut i en kolbe og 50 ml 1M HCl i metanol ble tilsatt. Blandingen ble rystet godt og satt til henstand over natten for å få løst all mannitol.

Felles prosedyretrinn for monosakkaridbestemmelse på nøytrale sukker, sure og aminosukker.

1 mg prøvemateriale ble veid ut i syrevasket supelcorør. Alle rørene ble dekket med perforert parafilm og prøvematerialet ble gjort vannfri ved å la prøvene stå i P_2O_5 vakuumsiktor i ca 20 timer ved romtemperatur. Deretter ble prøvene tilsatt 1 ml 4M HCl i metanol. Indrestandard (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ble så tilsatt. For test på aminosukker ble 100 μl mannitol (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) tilsatt, mens for nøytrale og sure monosakkarider ble 200 μl tilsatt. Kork ble skrudd på alle supelcorørene og satt i varmeskap ved 80°C i 20-24 timer. Etter 10-15 minutter ble korkene skrudd til igjen for å forhindre metanolfordamping. Prøvene ble dampet inn til tørrhet under N_2 strøm, før 200 μl vannfri metanol ble tilsatt som igjen ble dampet inn til tørrhet under N_2 strøm. Dette ble gjentatt 3 ganger.

Videre prosedyretrinn for test på nøytrale og sure sukker

Prøvene ble dekket med perforert parafilm og satt til tørking i P_2O_5 vakuumsiktor i 1 time ved romtemperatur før de ble TMS derivatisert. (metode 6.3.4)

Videre prosedyretrinn for test på aminosukker

Prøvene ble tilsatt 0,1 ml Pyridin og 0,1 ml ediksyreanhydrid. Prøvene sto i avtrekksskap i 2-3 minutter ved romtemperatur og dampet inn til tørrhet under N_2 strøm. 1 ml 0,5 M HCl i metanol ble tilsatt. Kork ble skrudd på supelcorørene og satt i varmeskap ved 65°C i 1 time. Prøvene ble dampet inn til tørrhet under N_2 strøm. 200 μl vannfri metanol ble tilsatt som igjen ble dampet inn til tørrhet under N_2 strøm. Prøvene ble dekket med perforert parafilm og satt til tørking i P_2O_5 vakuumsiktor i 1 time ved romtemperatur før de ble TMS derivatisert (metode 6.3.4)

TMS- derivatisering

Reagenser	Utstyr
TMS reagens: 1. Trimetylklorosilan (TMCS) (Supelco): 1ml 2. Heksametyldisilazan (HMDS) (Aldrich): 2 ml 3. Vannfri Pyridin (Merck): 5 ml	1. Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette) 2. SMI Capillaries (blå) 3. 5 ml glasspipette med peleusballong 4. Hansker og briller

Eksperimentell utførelse

De metanolyserte prøvene ble det tilsatt TMS reagens (2 ganger mengde tilsatt intern standard) og rystes godt. Prøvene ble så satt til henstand i minst 30 minutter ved romtemperatur før gasskromatografisk analyse.(metode 6.3.4)

Gasskromatografi**Utstyr og betingelser**

Gasskromatograf:	GC 600 VEGA SERIES 2 (CARLO ERBA INSTRUMENTS)
Programeringsenhet	ICU 600
Integrator:	C-R6A Chromatopac (Shimadzu)
Detektor:	Flammeionisasjonsdetektor
Injektor:	Fordampingsinjektor, Splitt:splittless
Kolonne:	DB5 (J&W scientific). "Fused silica" kappilærkolonne
Bæregass:	Helium
Flow:	Gjennom kolonna 1,8 ml/ min Split flow \approx 11 ml/ min Splittforhold 1:6
Injeksjonsvolum:	1 µl
Injektortemperatur:	260 °C
Detektortemperatur:	310 °C

Temperaturprogram 140 °C \longrightarrow 170 °C \longrightarrow 250 °C

Fenol svovelsyre testen

Reagenser	Utstyr
1. Fenol	1. Glassrør 6 ml.
2. Konsentrert svovelsyre	2. Finnpiquette 100-200 µl (Labsystems)
3. Destillert vann	3. Whirilimixer (Fisons)
	4. Mikroplate med flat bunn
	BIO-RAD MODELL 3550 MICROPLATEREADER
	Verneutstyr: (briller, laboratoriefrakk, hansker).

Eksperimentell utførelse

100-200 prøveløsning ble tilsatt glassrør. 1 ml konsentrert svovelsyre og 200 µl 4 % fenol ble tilsatt, blandet på whirilimixer. Referanseprøve 200 µl destillert vann ble tilsatt et glassrør, 1 ml konsentrert svovelsyre og 200 µl fenol ble tilsatt, blandet på whirilimixer. Blandingene ble så satt til henstand i romtemperatur i 30 minutter, deretter blandet på ny på whirilimixer. 100 µl av blandingen ble overført til hver sin brønn på en mikroplate. Absorbans ble målt ved 490 nm.

6.3.5 Strukturanalyser av polysakkaridfraksjoner**Karboksylysrereduksjon**

Reagenser	Utstyr
1. 500 mM imidazole-HCl	1. Metyleringsrør
2. 100 mg/ml NaBD ₄ /NaBH ₄ i imidazole-HCl	2. Is
3. Isedikk	3. PD- 10 kolonner
4. 0,2 M MES (2-(N-Morfolino) etan sulfonsyre)	4. Minishake som er på lab til Torunn
5. 2 M TRIZMA (Tris(hydroksymetyl)amin ometan)	5. Finn®- pipetter med spisser (Thermo labsystem)
6. 500 mg/ml nylaget N-cyclohexyl-N-(2-morpholinoetyl) carbodiimid	6. SMI pipette 100 µl
7. Oktanol	7. Rundkolber

Eksperimentell utførelse

Reduksjon før tilsetning av Carbodiimid

Metyleringsrør ble syrevasket. 2 mg prøve ble løst i 5 ml iskald 500 mM imidazole-HCl. Karboksylreduksjon ble gjort ved å tilsette 1 ml nylaget 100 mg/ml NaBD₄/NaBH₄ i imidazole-HCl, fordelt på 3 tilsetninger (300µl + 300µl+400µl), mikset etter hver tilsetning og satt til henstand på is, henholdsvis 5 min for de to første tilsetninger og 30 min etter siste tilsetning. Overskudd reduktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av 500µl isedikk, (5 x 100µl). Det ble kontrollert at pH var under 7. Løsningene ble dampet inn til 1-2ml (metode) og lavmolekylære substanser ble fjernet ved hjelp av PD 10 kolonne (metode 6.3.3). Prøvene ble frysetørket. (metode 6.1.5).

Reduksjon etter tilsetning av Carbodiimid

Prøvene ble løst i 1 ml vann, og tilsatt 200 µl 0,2 M Mes og 400 µl nylaget 500 mg/ml Carbodiimid i destillert vann. Løsningene ble mikset godt og inkubert i 3 timer ved 25-30°C.

Prøvene ble tilsatt 1 ml 2 M TRIZMA og 4 dråper Oktanol som antiskummiddel. Prøvene ble så avkjølt på is før de ble tilsatt 1 ml 70 mg/ml NaBD₄ i 0,05 M NaOH og inkubert over natten ved 4°C. Overskudd reduktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av 500µl isedikk, (5 x 100µl). Det ble kontrollert at pH var under 7. Løsningene ble dampet inn til 1-2ml (metode 6.1.9) og lavmolekylære substanser ble fjernet ved hjelp av PD 10 kolonne (metode 6.3.3). Prøvene ble overført i fra rundkolben til lange rør med skrukork, og frysetørket i stående stilling eller frysetørket direkte i rundkolben.(metode 6.1.5)

Metylering

Reagenser	Utstyr
1. Dimetylsulfoksid (DMSO)	1. Ristestativ
2. Metyljodid (CH ₃)	2. Agatmorter og pistill
3. Natrium hydroksid pellets	3. Brand Transferpettor 100 µl (Displacement Micropipette)
4. Vannfri Metanol (MeOH)	4. SMI capillaris (blå)
5. 100 mg /ml Natriumthiosulfat 5-hydrat i destillert vann	5. Torunns shaker
6. Kloroform	6. Sentrifuge(Berits lab)
	7. Oppsett til nitrogengass
	8. Varmeenhet for tørking under nitrogengass: Reacti-Therm TM III Heating Module (Pierce)

Eksperimentell utførelse

Frysetørket prøve ble tilsatt 500 µl DMSO og satt til risting i 20 minutter for å løse glykanene. NaOH pellets ble revet med DMSO i agatmorter med pistill til konsentrasjonen var 120 mg/ml (Tilsvarende 2 pellets per ml DMSO). Ved hjelp av SMI pipette ble 500 µl av DMSO/NaOH suspensjonen tilsatt rørene uten å komme i kontakt med glassveggen og satt til risting i 30 minutter. Det ble tilsatt 400 µl (100 µl + 100 µl + 200 µl) metyljodid. Etter de to første tilsetninger ble prøvene satt til risting i 10 minutter, og etter den siste tilsetning ble prøvene satt til risting i 20 minutter. Prøvene ble overført fra rundkolben til lange rør med skrukork og tilsatt 10 ml nylaget 100 mg/ml natriumthiosulfat i vann og 2 ml kloroform. Det ble blandet godt på whirlimixer og prøvene ble sentrifugert i 2-3 minutter for å få separert fasene. Vannfasen ble fjernet og kloroformfasen ble vasket med 4 X 5 ml vann. Etter hver vask ble blandingen ristet godt på whirlimixer og sentrifugert i 2-3 minutter. Kloroform fasen ble overført til mindre rør med skrukork og tørket under N₂-strøm.

Hydrolyse

Reagenser	Utstyr
1. 2,5 M Triklorediksyre (TFA)	1. Brand Transferpettor 100 µl (Displacement Micropipette) 2. SMI capillaris (blå) 3. Oppsett til nitrogengass 4. Varmeenhet for tørking under nitrogengass: Reacti-Therm TM III Heating Module (Pierce) 5. Oppsett til argongas 6. Varmeskap

Eksperimentell utførelse

De metylerte prøvene ble tilsatt 500 µl 2,5 M TFA, og boblet gjennom med argon gass. Prøvene ble hydrolysert i 2 timer ved 102°C i varmeskap, avkjølt og dampet til tørrhet under N₂ strøm

Reduksjon

Reagenser	Utstyr
<ol style="list-style-type: none"> 1. 2 M NH_3 2. 1 M NaBD_4 i NH_3, nylaget 3. Isedikk 4. 5 % edikksyre i destillert vann 5. Vannfri metanol 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Brand Transferpettor 100 μl (Displacement Micropipette) 2. SMI capillaris (blå) 3. Oppsett til nitrogengass 4. Varmeenhet for tørking under nitrogengass: Reacti-ThermTM III Heating Module (Pier 5. Varmeskap 6. 5 ml glasspipette med peleusballong 7. Ultralydbad

Eksperimentell utførelse

Prøvene fra metode (hydrolyse) ble tilsatt 500 μl 2 M NH_3 og 500 μl NaBD_4 i 2 M NH_3 . Løsningen ble sonikert (når nødvendig) i ca 1 minutt før inkubering i varmeskap ved 60°C i 1 time. Overskudd reduktant ble ødelagt ved langsom tilsatts av 3 X 50 μl isedikk. Prøvene ble dampet inn til tørrhet under N_2 strøm ved 40°C. Prøvene ble så tilsatt 2,5 ml 5 % edikksyre i metanol, og dampet inn til tørrhet under N_2 strøm ved 40°C. Dette ble gjentatt en gang. Prøvene ble tilsatt 2,5 ml vannfri metanol, og dampet inn til tørrhet under N_2 strøm ved 40°C. Dette ble gjentatt en gang.

Acetylering

Reagenser	Utstyr
<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 metylimidazole 2. Edikksyreanhydrid 3. Diklormetan 4. Destillert vann 5. Vannfri metanol 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Brand Transferpettor 100 μl (Displacement Micropipette) 2. SMI capillaris (blå) 3. Oppsett til nitrogengass 4. Varmeenhet for tørking under nitrogengass: Reacti-ThermTM III Heating Module (Pier 5. 2,5 og 10 ml glasspipette med peleusballong 6. Ultralydbad 7. Sentrifuge 8. Torun's shaker 9. Supelcorør: (syrevaskede) med teflonbelagt skrukork (PTFE/liner)

Eksperimentell utførelse

Residuet fra de reduserte prøvene ble tilsatt 200 µl 1-metylimidazol og 2 ml edikksyreanhydrid. Det ble blandet godt og satt til henstand i 10 minutter. 10 ml destillert vann ble tilsatt for å ødelegge overskudd av edikksyreanhydrid. Løsningene ble blandet og satt til henstand i ytterligere 10 minutter.

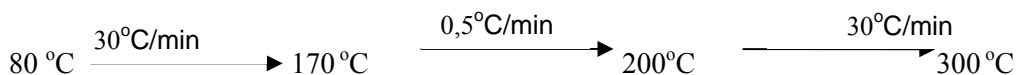
De delvis metylerte alditol-acetatene ble ekstrahert med 2 X 1 ml diklormetan (DCM). Etter hver tilsatts ble de blandet godt og sentrifugert i 2-3 minutter for å få god separasjon av de to ikke-blandbare fasene. DCM- fasene ble tatt vare på og slått sammen. DCM- fasen ble tilbakeekstrahert med 2 X 5 ml destillert vann. Etter hver tilsatts ble det blandet godt og sentrifugert 2-3 minutter for å få god separasjon av de to ikke-blandbare fasene. DCM- fasen ble overført til supelcorør og dampet inn til tørrhet under N₂-strøm ved 40°C. Residuet ble løst i 100 µl vannfri metanol og analysert ved GC/MS.

GC/MS

Utstyr og betingelser:

GC-MS:	Fisons GC 8065 (Fisons Instruments)
	Spekteret ble kjørt ved 70 eV
Detektor:	Masseselektiv
GC-kolonne	SPB-1 Fused silica
Injektor:	splitt:splittless
Filmtykkelse:	0,20 µm
Indre diameter:	0,20 µm
Lengde:	30 m
Temperaturområde:	80-300°C
Injektortemperatur:	250 °C

Temperaturprogram:



Svak syrehydrolyse

Reagenser	Utstyr
<ol style="list-style-type: none"> 1. 0,05 M Oksalsyre dihydrat (Merck) 2. Na_2CO_3 (Merck) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Supelcorør: (syrevaskede) med teflonbelagt skrukork (PTFE/liner) 2. pH papir 3. PD-10 kolonne 4. Varmeskap

Eksperimentell utførelse

5 mg prøve ble løst i 1 ml 50 med mer oksalsyre i et Supelcorør med skrukork. Løsningen ble satt i varmeskap i 2 timer ved 100°C, etter ca 15 minutter ble korken skrudd til for å forhindre fordamping av oksalsyre. Prøven ble avkjølt og nøytralisert med Na_2CO_3 til pH 7-8. Lavmolekylære substanser ble fjernet ved hjelp av PD 10 kolonne (metode) og prøvene ble frysetørket i supelcorøret i stående stilling. (metode). Avspaltet Araf ble bestemt ved monosakkaridbestemmelse (metode)

Felling av AG-II med Yariv antigen

Reagenser	Utstyr
<ol style="list-style-type: none"> 1. 2 mg/ml Yariv-antigen 2. 0,5 µg/ µl arabisk gummi stamløsning 3. 5 mg/ml prøveløsning <p><u>Løsning til en gelplate med 1 mm geltykkelse</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 35 mg agarose(merke) 2. 30 mg NaCl(merke) 3. 0,7 mg NaN_3 (merke) 4. 3,5 ml destillert vann 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Gelbondfilm for agarose(5 x 7 cm) 2. Varmeplate 3. Magnetrører 4. Vaterbord 5. Fuktkammer 6. Filterpapir 7. Finn®- pipetter med spisser (Thermo labsystem) 8. Absorberende papir 9. Glassplate 10. 2 liter flaske med vann til pressing av plater 11. Varmeskap

Eksperimentell utførelse

1 mg prøve ble løst i 200 µl destillert vann (5 mg/ml) og 1 mg arabisk gummi stamløsning ble løst i 2 ml destillert vann (0,5 mg/ml). Gelbondfilm for agarosegel ble klippet ut ca 5 x 7 cm, og det ble bestemt hvilken side som var hydrofil. Løsninger til to plater med geltykkelse 1 mm ble kokt opp i et dramglass med magnet. Aluminiumsfolie ble brukt for å forhindre fordampning. Rett før støping ble det tilsatt 17,5 µl Yariv 2 mg/ml løsning til den ene plata og 35 µl Yariv 2 mg/ml løsning til den andre plata. Gelbåndfilmen ble lagt i vater før gel-løsningene ble helt utover gelbåndfilmen. Etter at gelen hadde størknet ble det stanset ut små brønner ved hjelp av vakuumsug. Prøvene og standardløsningen ble overført til brønnene på gelen etter økende volum (2 µl, 4 µl og 6 µl). Platene ble lagt i et fuktkammer, med et fuktig filterpapir i bunnen og dekket med lokk. Etter henstand i ett døgn ble platene avlest visuelt, røde ringer rundt prøvene viser til arabinogalaktan-proteiner i prøven. Gelplatene ble så tørket ved å legge et fuktet filterpapir oppå gelene, samt en del lag av absorberende papir. En stor flaske med vann ble satt på toppen for å gi god press. Deretter ble gelplatene lagt til tork i et varmeskap ved 40°C.

Proteinbestemmelse

Reagenser	Utstyr
<u>Felling av proteiner</u> <ol style="list-style-type: none"> 1. 2 % Na-deoxykolat (aq) 2. 24 % Trikloredikksyre (aq) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Finn®- pipetter med spisser (Thermo labsystem) 2. Minishake den som er på lab 3. Glassrør 4. Sentrifuge (Multifuge 4KR Heareus) 5. Spektrometer (Thermo Spectronic Helius Epsilon Spectrophotometer, 660 nm).
<u>Lowry reagenser</u> <ol style="list-style-type: none"> 1. Lowry A: 2% Na_2CO_3 i 0,1 M NaOH (aq) 2. Lowry B: 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ i 1 % Tri-natriumcitrat. $2\text{H}_2\text{O}$ 3. Lowry C: 50 ml Lowry A +1 ml Lowry B (nylaget) 4. Lowry D: Folin fenolreagens fortynnet 1:2 med destillert vann. 	
<u>Standardkurve</u> Bovint serumalbumin (BSA) 1 mg/ml: Konsentrasjoner mellom 0-40 µl brukes til å lage standardkurven.	

Eksperimentell utførelse

0,5 mg (3 paralleller) prøve og 0-40 µl standard ble fortynnet med destillert vann til 3 ml. Hvert rør ble tilsatt 25 µl Na-deoxykolat (aq), ristet grundig og satt til henstand ved romtemperatur i 15 minutter. Løsningene ble så tilsatt 1 ml trikloreddiksyre (aq), blandet godt og sentrifugert i 30 minutter ved 3300 rpm. Supernatanten ble fjernet og bunnfallet ble løst i 1,5 ml Lowry C og blandet godt. 150 µl Lowry D ble tilsatt og blandet. Etter 45 min henstand i mørket ved romtemperatur ble absorbans avlest ved

Aminosyreanalyse

Reagenser	Utstyr
1. Vann	1. Vortex mikser
2. 6 M HCl	2. Varmeskap
3. "Loading buffer"	3. Biocal JC 5000 aminosyreanalysator

Eksperimentell utførelse

Prøven ble løst /slemmet opp i vann til konsentrasjon 10 µg/ µl. 10 µl, tilsvarende 100 µg ble tatt ut til hydrolyse med 6M HCl under vakuum ved 110°C. Røret ble tilsatt 200 µl "loading" buffer, vortexet for å løse aminosyrene og deretter ble bunnfallet spunnet vekk, før 20 µl ble injisert på BioCal JC 5000 aminosyreanalysatoren analysatoren. Et kromatogram ble tatt opp ved 570 nm og 440 nm.

Bestemmelse av native estergrupper i polysakkarider ved IR- spektroskopi

Reagenser	Utstyr
1. Kaliumbromid (KBr)	1. P ₂ O ₅ vakuumeksikator
	2. Morter og pistill
	3. Tablettpresse
	4. IR spektrometer (IR-408 (Shimadzu))

Eksperimentell utførelse

IR spektroskopi ble utført ved avdeling for legemiddelanalyse, Farmasøytisk institutt, under veiledning av Finn Tønnesen.

1-2 mg prøve ble tørket i P_2O_5 vakuumsiktor over natten ved romtemperatur. Etter tørking ble prøven og ca 200 mg kaliumbromid (KBr) blandet godt i en agatmørtel med pistill for å få en homogen finpulverisert blanding. KBr tabletten ble laget under vakuum og absorbanse ble målt med et IR spektrometer i bølgetallområde $4000-650\text{ cm}^{-1}$.

6.3.6 Måling av biologisk aktivitet

Komplementfikseringstesten

Reagenser	Utstyr
<ol style="list-style-type: none"> 1. Destillert vann 2. Natriumklorid (NaCl) 3. Veronal/BSA buffer: CFT pH 7,2 med 2 mg/ml Bovint Serum Albumin (BSA) 30 % og 0,02 natriumazid 4. Saueblod: Fra Sau hvit (journal) (Bygdøy kongsgård) 5. Antistoff: Virion 9020 Ambocptor 6. Komplement: Humant serum fra frivillig donor på folkehelse (journal) 7. Polysakkarid referanse: PM II, pektin polysakkaridfraksjon fra <i>Plantago Major L.</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sentrifuge: CP Centrifuge (Beckmann) 2. Varmeskap med ristepate: Termaks, 37°C 3. Finn®- pipetter med spisser (Thermo labsystem) 4. Mikrotiterplater: Rund og flat bunn med 96 brønner 5. Mikroplateleser: Thermomax 6. Whirlimixer

Eksperimentell utførelse

Komplementfikseringstesten ble utført på Statens institutt for folkehelse, under veiledning av professor Terje Michaelsen.

Vasking av saueblodceller før sensibilisering

Veronalbuffer (CFT pH 7,2) med 2mg/ml BSA og 0,02 % NaN_3 ble laget ved blande 250 ml veronalbuffer, 1,67 ml BSA og 0,5 ml NaN_3 . x μl saueblod ble tatt ut med pipette uten å slemme opp

blodet og overført til et reagensglass. Blodet ble vasket 2 ganger med 0,9 % NaCl og 1 gang med Veronal/BSA buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert i x min

Sensibilisering av blodceller

15 µl Virion 9020 Ambocptor, 60 µl pakkede saueblodceller og 5,925 ml veronal/BSA buffer ble inkubert ved risting ved 37°C i 30 minutter. Løsningen ble vasket 2 ganger med NaCl og 1 gang med veronal/BSA buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert i x minutter. Vaskevannet ble fjernet med plastpipette og blodet fortynnet med 5,940 ml veronal/ BSA buffer. Dette gir en 1 % løsning av saueblodceller.

Fortynning av prøvene

1 mg prøve ble løst i veronal/buffer slik at utgangskonsentrasjonen (stamløsningen) ble 1 mg/ml. En firefolds fortynningsrekke ble laget, 6 fortynninger av hver prøve (Tabell 5)

RØR	KONSENTRASJON	FORTYNNING
1	500 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl fra stamløsning
2	125 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 1
3	31 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 2
4	8 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 3
5	2 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 4
6	0,5 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 5

Tabell 5. Fireforholds fortynningsrekke av prøvene

Titreringskurve for komplementkilden

100 µl destillert vann ble tilsatt 4 brønner. 50 µl buffer ble tilsatt 24 brønner (4 brønner per fortynning). Det ble laget en forynningsrekke av komplement og buffer. Det ble tilsatt 50 µl komplement til brønnene med buffer. Platen ble dekket med bred, blank tape for å forhindre fordampning, og satt på risting ved 37°C i 30 minutter. 50 µl sensibiliserte ble tilsatt i hver og inkubert ved risting ved 37°C i 30 minutter. Platen ble sentrifugert i 4 minutter. 100 µl fra brønn ble overført til en flatbunnet brønn og sentrifugert. Absorbans ble lest ved 405 nm

Komplementfikseringstesten

50 µl (2 paralleller for hver fortynning) av hver fortynning ble tilsatt i brønner med runde bunner på en mikrotiterplate. Som 100 % lysekontroll tilsettes 100 µl i 2-3 brønner. Som kontroll tilsettes 50 µl veronal/BSA buffer. 50 µl av fortynnet komplement ble tilsatt hver brønn (Ikke i 100 % lysekontrollbrønnene). Tilsetting av komplement må skje raskt, siden komplement ødelegges raskt. Komplement tas opp av fryseren rett før bruk. Platen dekkes med bred, blank tape for å forhindre fordampning, og settes på risting ved 37°C i 30 minutter. 50 µl sensibiliserte blodceller (SRBC) ble tilsatt alle brønnene og inkubert ved risting ved 37°C i 30 minutter. Platen ble sentrifugert i 4 minutter. 100 µl av hver brønn ble overført til en flatbunnet plate og sentrifugert hvis det er luftboble der. Absorbans ble lest ved 405 nm.

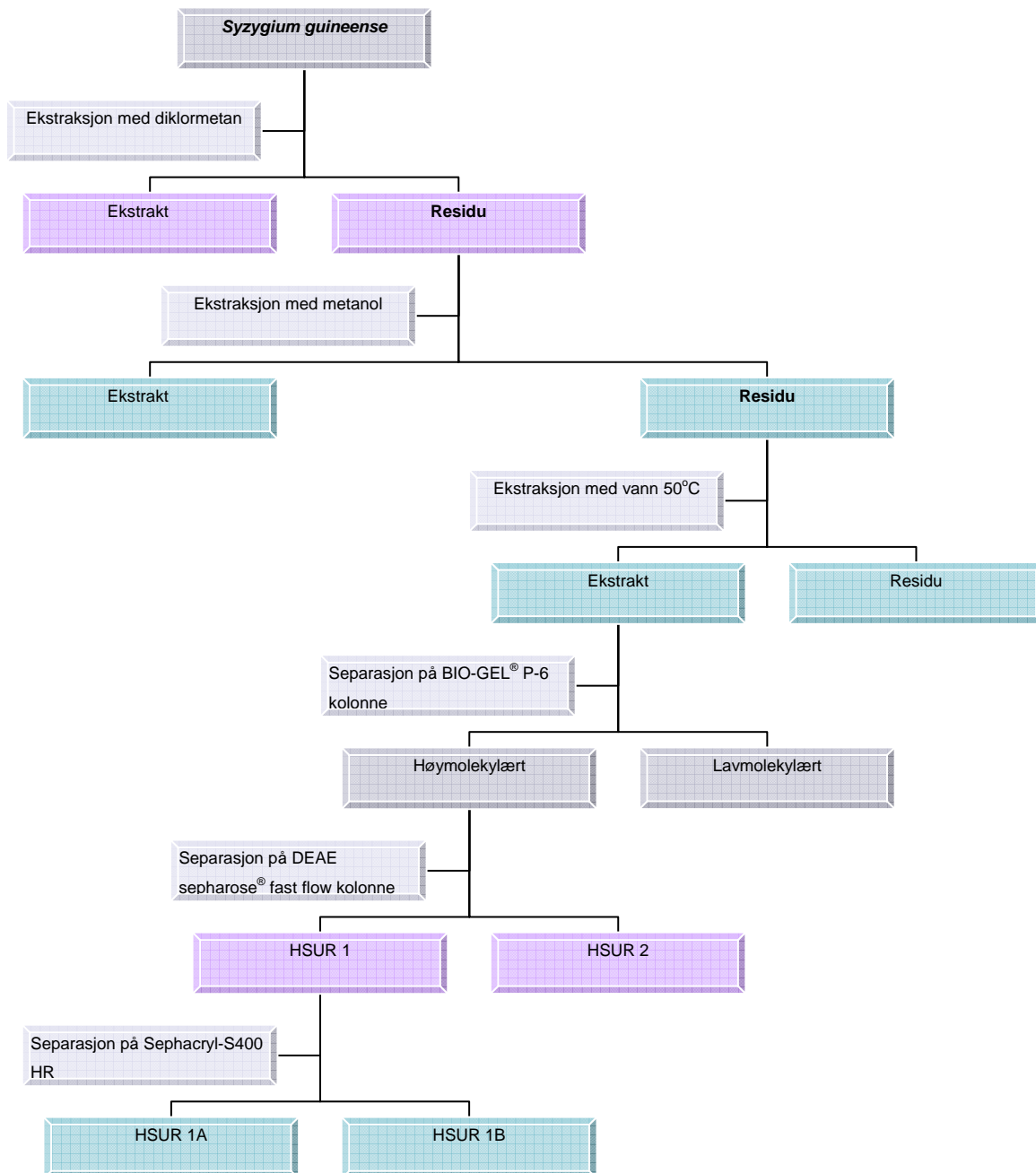
Måling av NO- frigjøring fra makrofag

Reagenser	Utstyr
1. Coulter counter Isoton buffer	1. Celle teller: Coulter counter
2. Dyrkningsmedium: RPMI 1640 tilsatt 10 % kalveserum, 1 % penicillin/streptomycin og 2 mM L-glutamin, 5 x 10 ⁻⁵ M 2-Mercaptoetanol.	2. Sentrifuge: Rotanta 460R, Beckman
3. Griess- reagens A: 1 % Sulfanilamid (Sigma S- 9251)	3. Celleinkubatorskap
4. Griess reagens B: 0, 1 % N-(1-naptyl)etylenediamine (Sigma N-9125) og 2,5 % fosforsyre.	4. Flatbunnet mikrotiterplate: V og U bunn
5. Cellelinje: R2-makrofager derivert fra rottemakrofager.	5. Absorbansmåler: Titertek Multiskan
	6. Multi- mikropipettor

Eksperimentell utførelse

Måling av NO frigjøring fra makrofag ble utført på Rikshospitalet av Marit Inngjerdingen og Parakashtha Ghildyal. Makrofager ble høstet fra cellekultur. For å telle cellene ble 20 µl celleduspensjon ble tilsatt 10 ml isoton buffer løsning. Cellene ble så telt i en celledeteller. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm i 5 minutter. Cellene ble resuspendert til 10^6 celler/ml i dyrkningsmedium. Celler ble stimulert i flatbunnet mikrotiterplate og tilsatt 50 µl celleduspensjon i hver brønn. 50 µl pektinekstrakt ble så tilsatt i hver brønn. Fortynningskrue av duplikater med 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml og 0,1 µg/ml pektinekstrakt ble laget. Celler ble inkubert over natten ved 37°C. 100 µl av supernatanten ble overført til en V- bunnet mikrotiterplate og sentrifugert ved 1300 rpm i 2 minutter. 50 µl av supernatanten ble overført til en U- bunnet mikrotiterplate. En standardkurve med kjente konsentrasjoner av NaNO_3 ble laget (100 µM, 10 µM, 5 µM, 1,25 µM og 0 µM). 50 µl Griess- reagens A ble tilsatt og satt til henstand i 10 minutter ved romtemperatur i mørke. 50 µl Griess- reagens B ble så tilsatt og absorbans ble målt ved 540 nm.

7. Resultater og diskusjon



Figur 25: Flytskjema over isolering og opprensning av polysakkaridfraksjoner fra *S. guineense* blader

Figur 25 viser flytskjema over isolering og opprensning av polysakkaridfraksjoner av *Syzygium guineense* blader Resultater og diskusjon av disse vil bli gitt i de kommende avsnitt.

7.1 Isolering og opprensning av polysakkaridfraksjoner

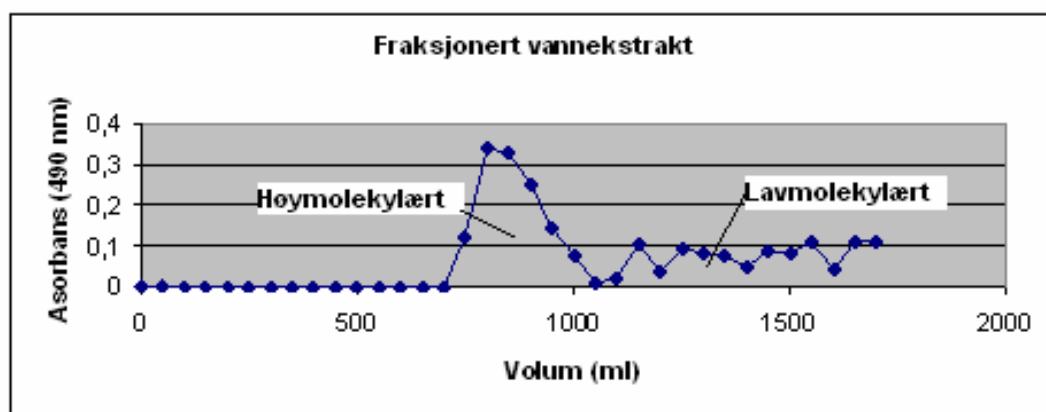
7.1.1 Ekstraksjon av plantematerialet

Tørket og finpulverisert plantematerialet ble ekstrahert i soxhlet med DCM og MeOH. Residuet ble tørket og deretter ekstrahert med vann ved 50°C. Den suksessive ekstraksjonen av plantematerialet førte til at plantekomponenter fordelte seg i løsningsmiddelet med ulik polaritet. De mest upolare forbindelsene ble ekstrahert over i DCM, de ikke fullt så upolare i MeOH og de mest polare forbindelsene ble igjen i vannekstraktet. Dette medførte en grov separering av forbindelsene i plantematerialet. Vannekstraktet var brunfarget. Vannekstraktet ble oppkonsentrert på rotavapor før forbindelsene i det oppkonsentrerte vannekstraktet ble videre fraksjonert og separert ved kolonnekromatografi.

Fraksjonering av vannekstraktet ved kolonnekromatografi: BIO-GEL® P-6

Polyakrylamidgel som gelmatriks

Vannekstraktet ble først fraksjonert og separert etter molekulstørrelser på en Bio-Gel® P6-DG kolonne. BIO-GEL® P-6 Polyakrylamidgel har et smalt fraksjoneringsområde på 1000-6000 Da. Dette medførte en grov separasjon av de høymolekylære forbindelsene fra de lavmolekylære forbindelsene i ekstraktet. Vannekstraktet ble dermed renset opp og gjort fri for mange av de lavmolekylære forbindelsene som salter og fargede forbindelser. 180 fraksjoner (10 og 15 ml) ble samlet, alle fraksjonene var fargeløse, det viser til at polysakkarider har blitt separert fra en del fargede forbindelser. Innhold av karbohydrat og deres karbohydratelueringprofil ble bestemt ved fenolsvovelsyre testen. Karbohydratelueringprofilen vises i figur 26, en stor topp i volumområdet ca 700 ml til ca 1100 ml viser til god absorbans for de høymolekylære polysakkaridene. Etter ca 1100 ml vises en mindre og ujevn topp for de lavmolekylære polysakkaridene, fraksjoner under denne toppen ble kastet. Alle høymolekylære fraksjoner ble samlet til en fraksjon, H.



Figur 26 Separasjon på Bio-Gel® P6-DG kolonne gav en høymolekylær fraksjon (fraksjon H) og en lavmolekylær fraksjon.

7.1.2 Kolonnekromatografisk separasjon av fraksjon H på ionebytterkolonne med DEAE-Sephrose som gelmatriks.

Fraksjon H ble separert på en DEAE- Sepharose Fast Flow ionebytterkolonne. Det samlede volumet av fraksjon H, ca 2000 ml ble filtrert 5 µm. 500 ml prøve ble applisert på kolonnen av gangen og sure og nøytrale fraksjoner ble separert. Det ble bestemt å kun studere de sure polysakkaridene, da tidligere arbeid på et 50°C vannekstrakt fra *S. guineense* blader med ionebytterkromatografi som fraksjoneringsmetode, viste et lavt utbytte av de nøytrale fraksjoner.[1] De nøytrale polysakkaridene ble eluert med 2 kolonnevolum med destillert vann og kastet. De sure polysakkarider ble eluert med en saltgradient, 0-2M NaCl. Denne saltgradienten ble bestemt da fraksjon H i første forsøk ble eluert med en saltgradient 0-1,5 M, men gav ufullstendig eluering av polysakkaridene. 180 fraksjoner ble samlet og innhold av karbohydrat og deres karbohydratelueringprofil ble bestemt ved fenolsvovelsyre testen. Karbohydratelueringprofilene for de 4 appliserte prøvene H1-H4 som vises i figur 27.1-27.4 ledet til to nye fraksjoner, HSUR 1 og HSUR 2. HSUR1 og HSUR2 ble dampet inn (metode 6.1.9), dialysert (metode 6.3.3) og frysetørket (metode 6.1.5). I tabell 5 vises utbytte av HSUR1 og HSUR2 etter separasjon på Bio-Gel® P6-DG kolonne og DEAE- Sepharose Fast Flow ionebytterkolonne.

Usikkerhet i fraksjoneringen

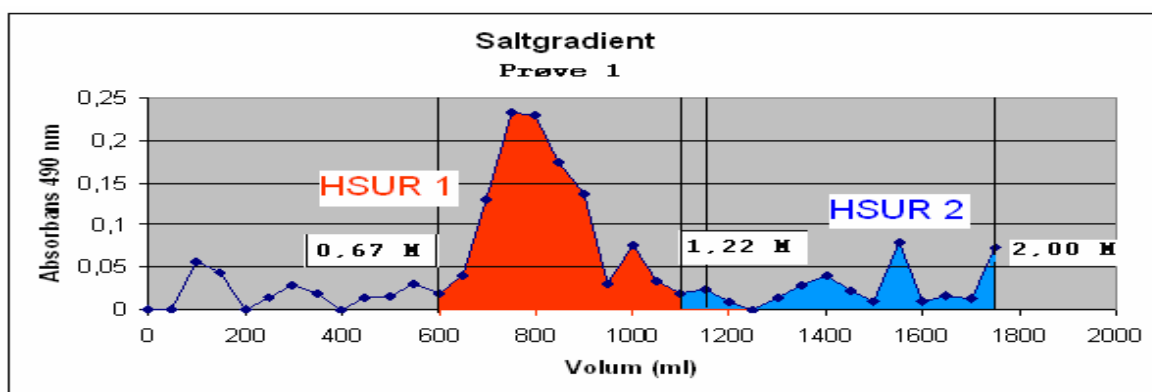
Det foreligger en usikkerhet for denne fraksjoneringen. Karbohydratelueringprofilene er ikke identiske. HSUR 1 i alle prøver elueres ved forskjellige saltkonsentrasjoner i område 0,44-1,5 M. HSUR 2 er en fraksjon hentet fra de øvre saltkonsentrasjoner for applisert prøve H1 og H3. Spesielt H3 viste høy nok absorbans til å anta at det kunne være polysakkarider i dette område, vel og merke vises den høyere absorbansen for H3 ved 1,33 M, dette er en saltkonsentrasjon som inngår i fraksjon HSUR1. HSUR 2 ble derfor samlet under tvil og det kan være at fraksjonene burde ha vært samlet annerledes.

Nye vurderinger etter fraksjonering på DEAE- Sepharose Fast Flow ionebytterkolonne

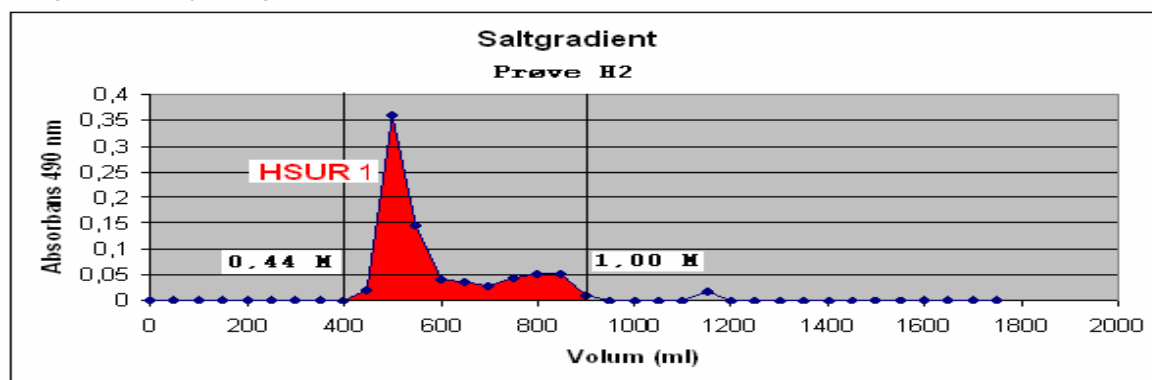
Etter å ha ekstrahert, fraksjonert og opprenset plantematerialet til to fraksjoner HSUR1 og HSUR2, vil det være av interesse å identifisere og bestemme fraksjonenes monosakkaridinnhold kvalitativt og kvantitativt, samtidig vil det være av interesse å belyse spørsmål for usikkerhet for fraksjon HSUR2. Ved å identifisere monosakkaridsammensetningen til hver fraksjon kan nye vurderinger som utførelse av ytterligere prøveopparbeidelse eller videre strukturstudier foretas. Det ble dermed bestemt å utføre en monosakkaridanalyse ved metanolyse, TMS derivatisering og GC.

Fraksjon	Utbytte (mg)	Utbytte (%)
HSUR1	251 mg	$4,79 \times 10^{-2}$
HSUR2	128 mg	$2,44 \times 10^{-2}$

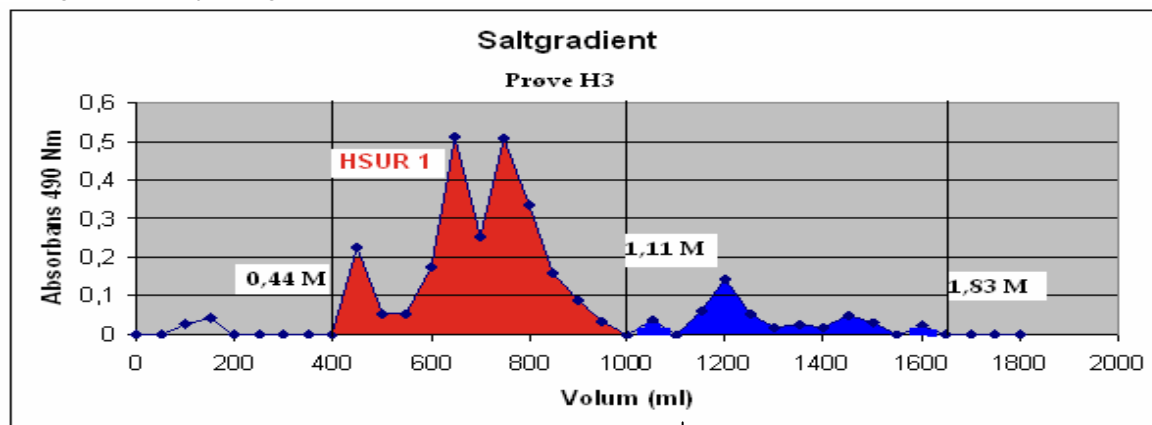
Tabell 5: Utbytte av fraksjon HSUR1 og HSUR2



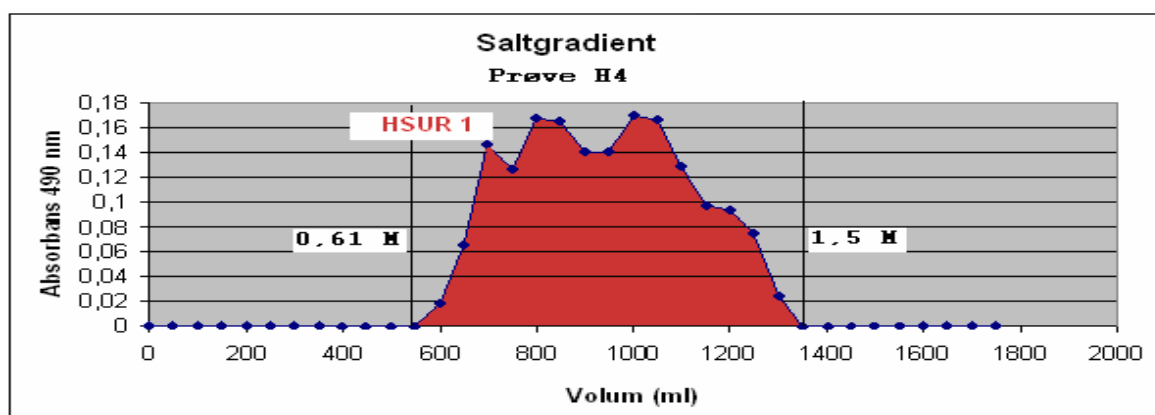
Figur 27.1 Fraksjonering av H1



Figur 27.2 Fraksjonering av H2



Figur 27.3 Fraksjonering av H3



Figur 27.4 Fraksjonering av H4

7.1.3 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av monosakkarider i HSUR 1 og HSUR 2 ved Metanolyse, TMS derivatisering og Gasskromatografi

HSUR 1 og HSUR 2 ble undersøkt for karbohydratsammensetning og innhold av aminosukker ved metanolyse, TMS derivatisering og gasskromatografi. Kjent mengde Mannitol ble tilsatt som intern standard for å få relative retensjonstider, samt for å muliggjøre kvantitativ bestemmelse. Det ble bestemt å tilsette 200 μ l IS, da 100 μ l fra tidligere utførte analyser viste seg gi for liten topp i kromatogrammet.[1] Et kromatogram for HSUR 1 og HSUR 2 ble tatt opp ved hjelp av temperaturprogrammert separasjon og en flammeionisasjonsdetektor.

HSUR 2 inneholdt ikke karbohydrat, dette belyser spørsmålet om usikkerhet i fraksjoneringen ved ionebytterkromatografi. Ingen av fraksjonene inneholdt aminosukker.

Monosakkaridsammensetningen i HSUR1 vises i tabell 6.

Monosakkarid Sammensetning	Mengde (µg)	Prosent av total karbohydratinnhold
Ara	129,61	29,4
Rha	39,81	9,0
Man	4,85	1,1
Gal	144,30	32,7
Glc	26,73	6,1
GalA	95,53	21,7
Total karbohydratinnhold(µg):	440,82	44,1 (w/w %)

Tabell 6: Karbohydratsammensetning i HSUR 1 i mengde og prosent av totalt karbohydratinnhold

Tabell 6 viser at HSUR 1 inneholder mye GalA, det kan tyde på innhold av pektinpolysakkaridenes uforgreinede hovedkjede, homogalakturenan. I tillegg har HSUR1 et høyt innhold av Ara og Gal som kan tyder på pektiner med arabinogalaktanstruktur og Rha kan stamme fra rhamnogalakturenaner. Et lite innhold av glukose kan skyldes forurensninger fra stivelse eller cellulose og Man kan stamme i fra hemicellulose.

Usikkerhet i resultatet

I gasskromatogrammet kommer det frem noen ukjente topper mellom rhamnose og xylose. Det er usikkert hva det kan være. Spor av Xylose mistenkes, men identifikasjon av Xylosetoppene vanskeligjøres ved forstyrrelse av de andre toppene i dette område. Protein eller metylerte sukker vil også elueres i dette område, slik at det mulig at fraksjon HSUR1 inneholder slike forbindelser. Generelt over hele gasskromatogrammet kommer det frem flere topper enn de som blir brukt til kvantitativ bestemmelse av hver type monosakkarid. Dette kan forklares med det faktum at hvert monosakkarid kan gi opphav til flere topper fordi de kan ha forskjellige konformasjoner og konfigurasjoner i løsning. Men toppene kan også skyldes forurensninger i prøven. Det antas at noen av toppene kan skyldes forurensninger, også for de toppene mellom rhamnose og xylose.

Nye vurderinger etter monosakkaridbestemmelse av HSUR1 og HSUR 2

Da HSUR2 ikke viste til innhold av karbohydrat ble det bestemt å kun gå videre med fraksjon HSUR1. Da det mistenkes at noen av toppene i gasskromatogrammet skyldes forurensninger ble det bestemt å rense de sure polysakkaridene ytterligere på en Sephacryl S-400-gelfiltreringskolonne før

videre analyser. Det ble bestemt å undersøke om toppene mellom xylose og rhamnose kan skyldes protein eller metylerte sukker i de videre studier.

7.1.4 Molekylvekt betemt fraksjonering av HSUR1 med Sephacryl-S400 som gelmatriks

På bakgrunn de ukjente toppene i gasskromatogrammet til HSUR 1 ble det bestemt å rense denne fraksjonen ytterligere på en Sephacryl-S400 gelfiltreringskolonne. I likhet med BIO-GEL® P-6 polyakrylamidgel vil forbindelser i prøven separeres etter molekulstørrelse på en Sephacryl-S400 gelfiltreringskolonne, men til gjengjeld har Sephacryl-S400 et bredere fraksjoneringsområde å separere over. Sephacryl-S400 egnest dermed til å finseparere forbindelser i HSUR 1 og rense denne fraksjonen for eventuelle forurensninger.

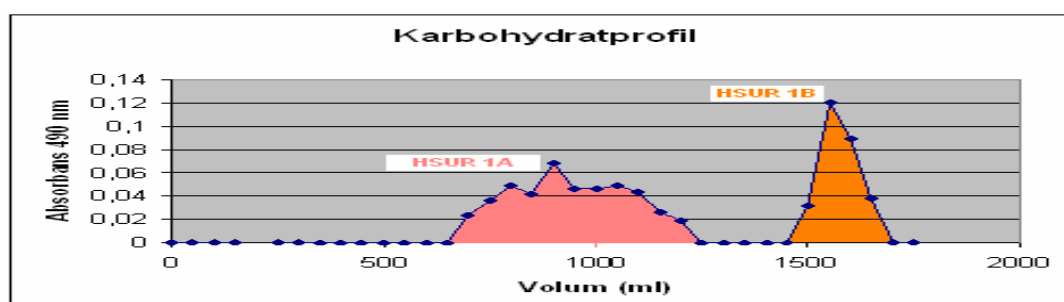
60 mg frysetørket HSUR1 ble løst i 10 ml degasset vann, filtrert 0,45 µm og applisert på kolonnen. Den totale mengden av HSUR1 var ca 240 mg, dermed ble 10 ml prøve applisert på kolonnen i 4 omganger. Polysakkarider i HSUR 1 ble eluert med degasset destillert vann, 180 fraksjoner ad 3 ml ble samlet. Innhold av karbohydrat og deres karbohydratelueringprofil ble bestemt ved fenolsvovelsyre testen. Karbohydratprofilen for de 4 appliserte prøvene var tilnærmet identiske. Figur 28 viser til to godt separerte topper, dette gav fraksjon HSUR1A som den høymolekylære fraksjonen av HSUR 1, og HSUR 1B som den lavmolekylære fraksjonen av HSUR1. Fraksjonene ble dampet inn, frysetørket og ubytte ble bestemt. Tabell 7 viser utbytte av HSUR1A og HSUR1B.

Nye vurderinger etter fraksjonering på Sephacryl-S400 gelfiltreringskolonne

For å undersøke om fraksjonering på Sephacryl-S400 gelfiltreringskolonne gav 2 nye fraksjoner, HSUR1A og HSUR1B med reduserte forurensningsmengder, og for å bestemme hvilke monosakkarider disse fraksjonene inneholdt ble det bestemt å utføre en monosakkaridanalyse ved metanolyse, TMS derivatisering og GC.

Fraksjon	Utbytte (mg)	Utbytte (%)
HSUR1A	35	$1,33 \times 10^{-2}$
HSUR1B	69,5	$6,68 \times 10^{-3}$

Tabell 7: Utbytte av fraksjon HSUR1 og HSUR2



Figur 28 Separasjon på Sephacryl-S400 kolonne gav to nye fraksjoner. HSUR 1A som den høymolekylære fraksjon og HSUR 1B som den lavmolekylære fraksjon av HSUR 1B.

7.1.5 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av monosakkarider i HSUR 1A og HSUR1B

Metanolyse, TMS derivatisering og gasskromatografi

Karbohydratsammensetningen og det totale karbohydratinhold i HSUR 1A og HSUR 1B ble bestemt ved Metanolyse, TMS derivatisering og Gasskromatografi. Et gasskromatogram for hver fraksjon ble tatt opp og de karakteristiske toppene ble brukt til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av fraksjonenes monosakkaridsammensetning. Gasskromatogrammet ble også brukt til å undersøke om disse fraksjonene har reduserte forurensningsmengder sammenliknet med HSUR1. Resultatene er vist i tabell 8.

Monosakkarid Sammensetning	HSUR 1A		HSUR 1B	
	Mengde (µg)	Prosent av total karbohydratinhold	Mengde (µg)	Prosent av total karbohydratinhold
Ara	316,80	44,6 %	114,75	30,4
Rha	28,27	4,0 %	50,74	13,5
Man	6,38	0,1 %	14,89	4,0
Gal	302,94	42,7 %	144,33	38,30
Glc	9,0	1,3 %	7,94	2,1
GalA	52,0	7,3 %	44,35	11,8
Total karbohydratinhold(µg):	709,88		377,00	

Tabell 8: Karbohydratsammensetning i HSUR 1A og HSUR 1 B gitt i µg og % av total karbohydratinhold

Tabell 8 viser at HSUR 1A og HSUR1B i likhet med HSUR1 har et høyt innhold av Ara og Gal. I tillegg har begge fraksjonene et moderat innhold av GalA, men HSUR1B har et noe høyere innhold enn HSUR1A. Sammenliknet med HSUR1 har HSUR1A og HSUR1B et betraktelig lavere innhold av GalA. Begge fraksjoner inneholder Rha, men mengden er betraktelig større i HSUR1B. Glukosemengden har blitt redusert etter opprensning på Sephacryl S-400-gelfiltreringskolonnen.

Resultatene for denne analysen samsvarer med resultatene Rusten fikk for sine analoge fraksjoner Sg50A1 og Sg50A2. Disse fraksjonene som har fulgt samme isolering og opprensningsforløp som HSUR1A og HSUR1B inneholdt mye Ara og Gal og et lite innhold av GalA. Som HSUR 2 var innholdet av GalA størst i 50A2. Rusten fant også at karbohydratsammensetningen for et 100°C

vannekstrakt innholdt betraktelig mindre Ara og Gal enn et 50°C vannekstrakt. Et høyt innhold av Ara og Gal og et moderat innhold av Rha gjør det rimelig å anta at HSUR 1A og HSUR 1B kan inneholde pektiner som rhamnogalakturonaner (RG) og arabinogalaktaner (AG).

Usikkerhet i resultatet

Toppene som kom frem mellom rhamnose og xylose før opprensning på Sephacryl S-400-gelfiltreringskolonnen er fortsatt tilstedet. Det er usikkert hva dette kan være. Spor av Xylose er fortsatt mistenkt, men identifikasjon av Xylosetoppene lar seg ikke gjøre blant de andre toppene i dette område. Disse toppene kan også skyldes andre forurensninger som ikke lot seg eliminere på Sephacryl S-400-gelfiltreringskolonnen. Som tidligere nevnt kan toppene også skyldes protein eller metylerte sukker.

Nye vurderinger etter monosakkaridbestemmelse av HSUR1A og HSUR1B

Det høye innholdet av Ara og Gal kan stamme i fra AGII strukturer, det ble bestemt å undersøke fraksjonene for dette ved bruk av Yariv reagens. For å belyse spørsmål i usikkerhet i resultatet ble det bestemt å undersøke hver fraksjon for proteininnhold ved Lowry modifiserte metode.

7.2 Strukturanalyser

7.2.1 Strukturbestemmelse av fraksjon HSUR1A OG HSUR1B ved Yariv metode

Test for AG-II strukturer

På grunn av det store innholdet av Ara og Gal i HSUR1A og HSUR1B bestemt ved monosakkarid analyse, ble det bestemt å undersøke om fraksjonene kunne ha et innhold av AG II. Det ble utført en Yariv test der β -D-glukosyl Yariv antigen danner et presipitat med AG II -strukturer. Røde ringer rundt brønnene indikerer dannelse av presipitat. Yariv test på begge fraksjoner ble utført ved en konsentrasjon 5 mg/ml prøveløsning. 0,5 mg/ml arabisk gummi stamløsning ble brukt som positiv kontroll, og testen ble utført med Yariv reagens, 35 μ l og 70 μ l.

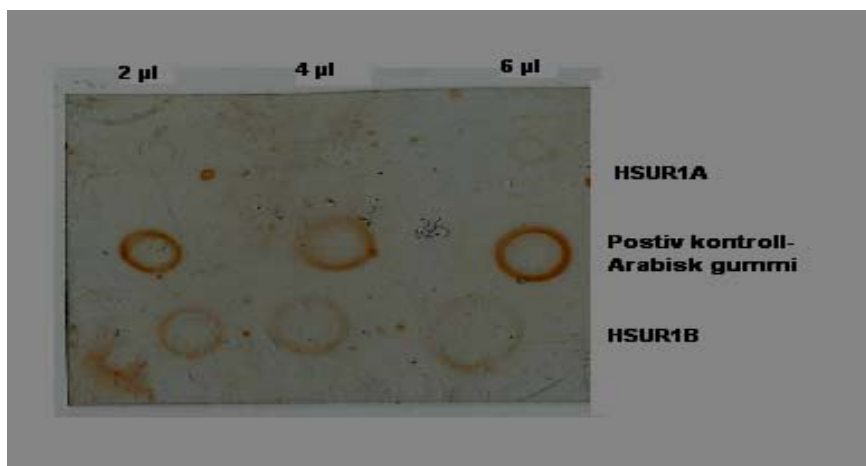
HSUR1B viser til innhold av AG II, bare spor av AG II ble vist i HSUR1A.(figur 29). Det kan tyde på at det høye innholdet av Ara og Gal i HSUR1A kommer i fra andre strukturformer enn AGII-strukturer. Som nevnt innledningsvis er AG II ofte del av arabinogalaktan-proteiner (AGP) i plantecelleveggen. (4.3.2.5)

Usikkerhet i resultatet

70 μ l Yariv reagens gav de mest tydelige resultater, men ikke så tydelig som ønsket. Det kan være at mer en konsentrert Yariv reagens ville ha gitt et bedre resultat. Pipettering er et kritisk punkt i Yariv metoden, svært små mengder skal tilsettes, noe som gjør at pipetteringen må være særdeles nøyaktig for å få med hele volumet som skal tilsettes. Pipettespissen bør tørkes av rett før prøvolumet skal tilsettes. At resultatet ikke er så tydelig som forventet kan skyldes unøyaktig pipettering.

Nye vurderinger etter Yariv test på HSUR1A og HSUR1B

Da både AGP og AG II har vist til mange viktige funksjoner er innhold av AG II og AGP av interesse. AG II har i mange studier vist til effekt på komplementsystemet, dermed vil det være interessant å utføre en komplementfikseringstest på fraksjoner med innhold av AG II. Ved å finne bindingsforhold til hver fraksjon kan dette bidra til å finne strukturelle trekk i hver fraksjon. Det ble dermed bestemt å identifisere hvilke type bindinger som inngår i fraksjonene ved metylering og GC/MS



Figur 29: Resultat fra Yariv test med 70 µl Yariv reagens

7.2.2 Proteinbestemmelse av HSUR 1 A og HSUR 1B ved Lowry metode

Da karbohydratsammensetningen og det totale karbohydratinnhold i HSUR1A og HSUR1B ble bestemt ved metanolyse, TMS derivatisering og gasskromatografi kom det frem i gasskromatogrammet til HSUR1A og HSUR1B noen ukjente topper mellom rhamnose og xylose. Dette kan være protein. Ved Yariv- test ble det påvist at HSUR1B inneholdt AGII strukturer, mens HSUR1A inneholdt bare spor. Da AGII ofte er bundet til et kjerneprotein rik på Hydroksyprolin, Alanin, Serin, Treonin og Glycin i plantecelleveggen kan begge fraksjoner inneholde protein. På bakgrunn av disse observasjonene ble det bestemt å utføre en Lowry test på begge fraksjonene for bestemmelse av protein i prøvene.

Lowry test er svært sensitiv og enkel metode å utføre, men vil lett feiles med tilstedeværelse av en del forbindelser som kan interferere med metoden. Derfor ble proteinene isolert ved å felle de ut. Fargereaksjonen ble så utført og absorbans ble målt ved 660 nm. En standardkurve med kjente konsentrasjoner av bovint serumalbumin (BSA) ble laget for estimere mengde protein i prøven (Figur 30), det er her viktig å presisere at standardkurven kun vil gi en tilnærmet bestemmelse av proteininnhold i prøven. Absorbans for 3 paralleller ble målt og gjennomsnittet av disse ble beregnet. Ut fra likningen til standardkurven ble proteinkonsentrasjonen i hver fraksjon bestemt og proteininnholdet ble kalkulert i prosentvis mengde. Resultatene ble:

HSUR1A: 0,3 %

HSUR 1B: 2,3 %

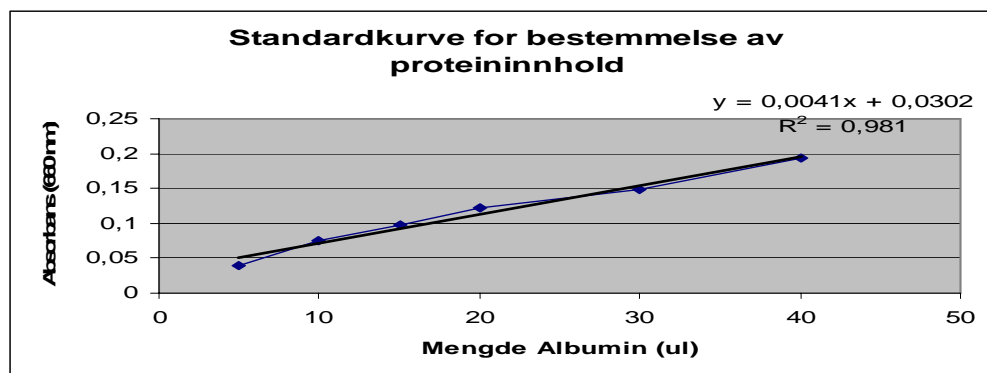
Resultatene viser at HSUR1B inneholder betraktelig mer protein enn HSUR1A. Dette stemmer overens med funnet ved Yariv test. Resultatene støtter opp forslaget om at HSUR1B har et innhold av AGP, mens HSUR1A kun har spor av AGP.

Usikkerhet i resultatet

Ut fra det standardkurven viser vil de laveste proteinkonsentrasjoner gi et avvik fra den lineære sammenhengen (Figur 30), det betyr at det foreligger en usikkerhet om resultatet for HSUR1A er rett. Men hvis en trekker en linje mot resultatene fra Yariv test vil resultatet for HSUR1A sannsynlig være rett. Det kan være at proteininnholdet av HSUR1B er enda høyere enn det resultatet viser, dette da det var vanskelig å fjerne forurensningene uten å få med seg noe av presipitatet da proteinene ble felt ut og supernatanten fjernet.

Nye vurderinger etter proteinbestemmelse ved på fraksjon HSUR1A og HSUR1B

Da det mistenkes at HSUR1B kan ha et innhold av AGP, der et kjerneprotein er rik på Hydroksyprolin, Alanin, Serin, Treonin og Glycin, kan det være interessant å undersøke hvilke aminosyrer som inngår i fraksjon HSUR1B. Det ble bestemt å utføre en aminosyrebestemmelse på fraksjon HSUR1B.



Figur 30: Standardkurve basert på kjente konsentrasjoner av bovint serumalbumin (BSA).

7.2.3 Aminosyreanalyse på fraksjon HSUR1B

Fraksjon HSUR1B viser til 2,3 % protein. Aminosyreanalysen viser at konsentrasjon av aminosyrer er relativt lav, mye av massen må komme i fra polysakkarider og andre stoffer enn proteiner/peptider. Absorbans ble målt ved 570 nm og 440 nm. Det er 570 nm som brukes til kvantisering, med unntak av Pro der 440 nm benyttes. Resultatet for aminosyreanalysen vises i tabell 9.

Aminosyre	Mengde (med mer)	Relativ mengde (%)
Asparaginsyre	0,1057	5,73
Treonin	0,1146	6,22
Serin	0,4003	21,71
Glutamat	0,3171	17,20
Glycin	0,3421	18,55
Alanin	0,2241	12,16
Cystein	0,0244	1,32
Valin	0,0977	5,30
Isoleucin	0,0524	2,84
Leucin	0,0727	3,94
Histidin	0,0449	2,44
Lysin	0,0478	2,59
Hydroxyprolin (Hyp) (440)	0,0957	6,2

Tabell 9: Resultat fra aminosyreanalyse

HUR1B har et høyt innhold av Serin, Alanin, Serin, og Glycin, samt et moderat innhold av hydroksyprolin og Treonin. Disse aminosyrene er typisk for AGP, dermed er det rimelig å anta at HSUR1B kan ha et innhold av AGP struktur.

Usikkerhet i resultatet

Det foreligger en usikkerhet i resultatet for hydroksyprolin(Hyp) da standarden som ble benyttes var gammel og inneholdt kun små mengder av Hyp. Hyp elueres rett før Asp, det kan være at en liten Hyp topp vil være skjult i Asp toppen da Asp absorberer ved 440 nm til en viss grad. En liten topp kan også være en ujevnhet i grunnlinjen.

7.2.4 Bindingsforhold i fraksjon HSUR1A og HSUR1B

Karboksylysyrreduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC/MS ble gjort for bestemme hvordan de ulike monosakkaridene bindes i hver fraksjon. Målet er å belyse spørsmål etter resultat fra metanolyse og GC, om HSUR1A og HSUR1B kan inneholde pektiner av type arabinogalaktaner og rhamnogalakturonaner.

Monosakkaridene konverteres til delvis metylerte alditol-acetater før de analyseres ved GC/MS. Retensjonstid (GC) og fragmenteringsmønster (MS) ble brukt til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av hvert enkelt monosakkarid og deres bindingstype. Arealet under en bestemt bindingstype som tilhører et bestemt monosakkarid ble integrert for kvantitativ bestemmelse. Det ble så bestemt hvor mye dette arealet utgjorde av det totale arealet for alle bindingstyper knyttet til det bestemte monosakkaridet. Resultatene ble så justert i forhold til monosakkaridmengdene funnet med metanolyse og GC. Resultatene vises i tabell 10.

Monosakkarid	Bindingstype	HSUR1A	HSUR1B
Arabinose	Tf	26,03	16,52
	1,3	0,77	3,32
	1,5	5,32	7,85
	1,3,5	1,39	2,40
	1,2,5	8,80	0,22
Rhamnose	T	1,86	0,64
	1,2	1,50	6,99
	1,2,4	0,63	5,70
Xylose		Spor	Spor
Glukose	T	Spor	2,1
	1,4	1,30	
Galaktose	T	2,36	0,16
	1,3	4,50	0,41
	1,4	Spor	
	1,6	2,00	0,19
	1,3,4	3,46	0,99
	1,4,6	2,61	-
	1,3,4,6	9,89	2,67
	1,3,6	17,84	32,47
Galakturonsyre	1,4	7,30	11,80

Tabell 10: Prosentvis fordeling av de ulike monosakkarider og deres bindingstype. Resultatene er justert i forhold til monosakkaridmengdene funnet med metanolyse og GC

Bindingsforhold i HSUR 1A**Arabinogalaktaner**

Det totale innholdet av Gal og Ara i HSUR1A ble bestemt til å være 87,3 % etter metanolyse og GC. Et høyt innhold av disse monosakkaridene ledet til en mistanke om AG-II, men HSUR1A viste til negativ Yariv test, det ble dermed ble en ny hypotese om at det høye innholdet av Ara og Gal i HSUR1A må komme i fra andre strukturformer enn AG-II. Resultatene fra metylering og GC/MS, vist i tabell 11, støtter ikke denne antagelsen. HSUR1A inneholder mye 1,3 Gal, 1,6 Gal og 1,3,6 Gal, derav 17,84 % er 1,3,6 Gal. Videre inneholder HSUR1A mye 1,5 Araf, 1,3,5 Araf og spesielt mye T-Araf. Dette er typiske strukturelementer i AG-II. Både kjede med 1,3 Gal og 1,6 Gal kan inngå, der sidekjeder av 1,5 Araf og terminal Araf bindes. Spor av 1,4 Gal og 1,3,4 Gal kan tyde på innhold av AG-I. Tabell 11 viser også til et resultat som gir en sterk indikasjon på at HSUR1A har en svært kompleks struktur. Høy forekomst av Gal 1,3,6 og Gal 1,3,4,6 viser til mange forgreninger. Denne hypotesen støttes av de mange terminale grupper. 30,25 % terminale grupper tyder på en struktur der forgreninger forekommer hyppig.

Arabinaner

Den høye forekomsten av forskjellige typer Ara kan tyde på Arabinaner. Ara 1,2,5 og Ara 1,3,5 kan tyde på en hovedkjede av 1,5 bundet Araf med forgreningspunkt primært i posisjon C2. Det er også påvist en del terminal Araf. Arabinanene er mest sannsynlig forgrenet, og som nevnt innledningsvis forekommer Arabinaner sjeldent i fri form, men bundet til Galaktaner. Dette stemmer overens med det store innholdet av Ara og Gal, forholdet mellom disse er relativt like.

Rhamnogalakturonaner

HSUR1A inneholder ikke så mye Rhamnose, men av den mengden som er tilstede er det funnet mest T-Rha. Noe av er også Rha 1,2 og Rha 1,2,4. Samtidig er GalA 1,4 er funnet. Det er da nærliggende å tro at hovedkjeden kan inneholde alterende Rha og Gal-A enheter med forgreninger i posisjon C4 på Rha. Disse funn kan tyde på RG-I. Da det tyder på at HSUR1A har et innhold av mange forgreninger støtter dette opp forslaget om "hårete områder" som er karakteristisk for RG-I.

Bindingsforhold i HSUR 1B**Arabinogalaktaner**

Galaktose og arabinose utgjør ca 70 % av det totale monosakkarid innholdet i HSUR1B. HSUR1B viste til innhold av AG-II struktur ved Yariv test og til AGP ved Lowry modifiserte metode og aminosyreanalyse. Resultat fra metylering og GC/MS vist i tabell 11 støtter hypotesen om at

HSUR1B har et innhold av AG-II og AGP. HSUR1B inneholder Gal 1,3, Gal 1,6, Gal 1,3,6. Fraksjonen inneholder hele 32,47 % Gal 1,3,6. Det meste av Ara foreligger som 1,5 Araf og T-Araf.. Til kjeder av Gal 1,3 og Gal 1,6 kan sidekjeder av 1,5 Araf og T-Araf bindes og danne den karakteristiske AG-II strukturen. Det ble ikke funnet Gal 1,4 i HSUR1B, det betyr at AG-I lite trolig finnes i HSUR1B.

Tabell 11 viser også til et resultat som gir en sterk indikasjon på at HSUR1B har en svært kompleks struktur. Høy forekomst av Gal 1,3,6 og Gal 1,3,4,6 viser til mange forgreninger. HSUR1B inneholder 19,5 % terminale grupper, det kan også bety at fraksjonen har en del forgreninger.

Arabinaner

Den høye forekomsten av forskjellige typer Ara kan også tyde på Arabinaner. Disse er mest sannsynlig forgrenet, og som nevnt innledningsvis forekommer Arabinaner sjeldent i fri form, men bundet til Galaktaner. Dette stemmer overens med det store innholdet av Ara og Gal, forholdet mellom disse er relativt like.

Rhamnogalakturonaner

Fraksjonen inneholder moderate mengder av GalA og Rha og forholdet mellom disse er relativt like. Dette forholdet, samt forslaget om mange forgreninger kan tyde på at HSUR1B inneholder ”hårete områder” som er karakteristisk for RG-1. Et moderat innhold av Rha 1,2,4 tyder på RG-I. HSUR1B inneholder 1,4 GalA og 1,2 Rha, dette er en indikasjon på pektinpolysakkaridenes glatte område, homogalakturonan.

Usikkerhet i resultatene

Tolkning av GC/MS- spektre vil være noe unøyaktig. Dersom kolonnen overbelastes kan ulike bindingstyper inngå i samme topp, GC/MS er i tillegg en ekstremt sensitiv metode noe som gjør at forurensninger ofte følger med i kromatogrammet, og noen av disse forurensningene kan inngå i samme topp som monosakkaridene. Samtidig kan resultatene fra monosakkaridbestemmelse avvike fra det reelle. Det betyr at ingen eksakt struktur kan bestemmes, og det vil foreligge en usikkerhet bak resultatene.

Resultatet som vises i tabell 10 viser til den totale mengden GalA, og skiller ikke mellom GalA og MeGalA. Hvis reduksjonen utføres over selektive reduksjonstrinn som nevnt under metode 2.3.3.1 kan den totale mengde uronsyre, andel fri uronsyre og andel metylesterfisert uronsyre bestemmes. Dette vil være av spesiell interesse når fraksjoner inneholder mye galakturonsyre, når fraksjonene er dårlige løselige i vann og har en tendens til danne gel. For HSUR1A og HSUR1B ble alle 3 foreslåtte metodeprinsipper forsøkt, men ettersom de to siste utførelsene feilet kom det ikke noen resultater ut

av dette forsøket. Det er usikkert hvorfor de 2 siste forsøkene feilet, men en mulig forklaring kan være at detektoren i GC/MS var så forurenset at signalene ikke ble vist. Ikke- optimal reaksjonstid for reagensene, ikke kalibrerte pipetter og liknende kan også være mulige feilkilder. Men i og med at fraksjon HSUR1A og HSUR1B ikke inneholder så mye uronsyrer og at begge fraksjonene er svært lettløselige i vann kan en gå ut i fra at uronsyrene mest sannsynlig er frie. Det er dermed nærliggende å anta at resultatene fra første forsøk vil være tilfredsstillende for bestemmelse av bindingstypene.

Araf 1,5 og Arap 1,4 kan ikke skilles ved GC/MS. Dette kan lett undersøkes for ved sur syrehydrolyse eller ved en enzymtest med Arabinofuranosidase som spalter Araf men ikke Arap. Rusten antok at Ara forligger på furanoseform, en antagelse basert på resultater fra tidligere analyser av lignende forbindelser.[1]

Nye vurderinger etter bestemmelse av bindingstyper i fraksjon HSUR1A og HSUR1B

For å oppklare om Ara forligger på furanoseform eller pyranoseform ble det bestemt å utføre en svak syrehydrolyse på fraksjon HSUR1B. For å videre strukturopklare begge fraksjoner, skal fraksjonenes molekylvektintervall bestemmes. For å undersøke om uronsyrene er mest sannsynlig frie eller metylesterfiserte kan dette lett bestemmes ved IR spektroskopi, det ble dermed bestemt å utføre en IR analyse.

7.2.5 Svak syrehydrolyse: Bestemmelse av Araf i fraksjon HSUR1B

Araf ble spaltet av polysakkaridstrukturene ved en svak syrehydrolyse (metode 6.3.5) i fraksjon HSUR1B. Monosakkaridsammensetningen og det totale karbohydratinnhold ble bestemt ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC (metode 6.3.4). Resultatet er vist i tabell 11.

	Før svak sure hydrolyse		Etter svak syrehydrolyse	
Monosakkarid Sammensetning	Mengde (µg)	Prosent av total karbohydratinnhold	Mengde (µg)	Prosent av total karbohydratinnhold
Ara	114,75	30,4	2,96	2,2
Rha	50,74	13,5	12,53	9,4
Man	14,89	4,0	1,07	0,8
Gal	144,33	38,30	48,89	36,8
Glc	7,94	2,1	3,29	2,5
GalA	44,35	11,8	41,83	31,5
Total karbohydratinnhold(µg):	377,00	37,7 (w/w %)	132,86	22,1 (w/w %)

Tabell 11: Karbohydratsammensetning i HSUR 1 B før og etter svak syrehydrolyse gitt i µg og %, og det totale karbohydratinnhold gitt i µg og (w/w %).

Tabell 11 viser at Ara er kraftig redusert. Før svak syrehydrolyse var den estimerte mengden av Ara 114,75 µg, etter svak syrehydrolyse ble den estimerte mengden Ara 2,9 µg. Dette betyr at det Ara er redusert med 97,4 %. Det tyder dermed på at det meste av Ara foreligger på furanoseform.

Tabell 11 viser til verdier som ikke vil være reelt. Da Araf er kraftig redusert ved svak syrehydrolyse, vil den prosentvise mengden av de andre monosakkaridene øke betraktelig. Gasskromatogrammet viste derimot noe interessant. En monosakkaridbestemmelse før svak syrehydrolyse viste til noen ukjente topper mellom rhamnose og xylose. Spor av Xylose ble mistenkt, men det lot seg ikke gjøre å identifisere så små topper blant mange andre større topper i kromatogrammet. Etter sur syrehydrolyse var toppene mellom rhamnose og xylose forsvunnet, kun to små topper for Xylose viste seg i dette område og dette bekrefter mistanken om at HSUR1B har spor av Xylose. Hvorfor de andre toppene forsvant og hva dette kan være er fortsatt uvisst. I tillegg ble det etter svak syre hydrolyse vist innhold av glukuronsyre.

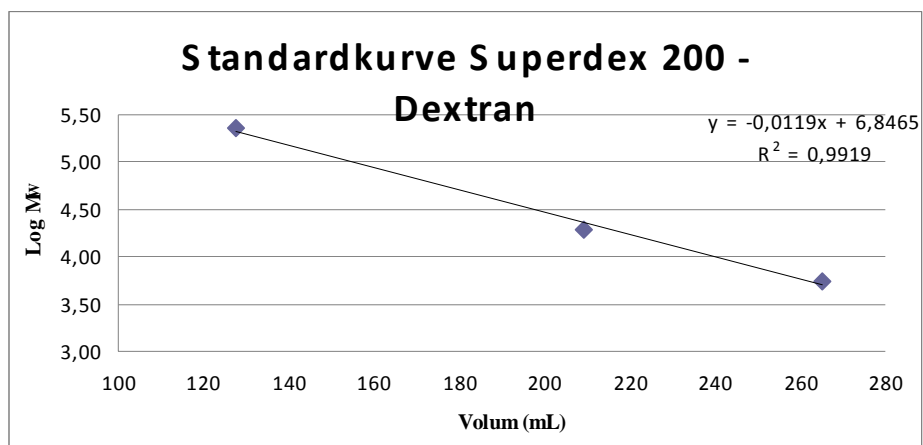
7.2.6 Påvisning av native estergrupper ved IR- spektroskopi i HSUR1A og HSUR 1B

Det ble undersøkt om HSUR1A og HSUR1B hadde nativt substituerte estergrupper eller metylforestrede uronsyrer ved IR spektroskopi. De native estergrupper vil ha karakteristiske absorpsjonsbånd i IR spekteret ved ca 1750 og 1300 cm^{-1} . Et kromatogram ble tatt opp i bølgetallområde 4000-650 cm^{-1} . Kromatogrammene viser ingen kraftig bånd ved 1750 og 1300 cm^{-1} , kun spor av estergrupper vises. Dette virker rimelig da forekomsten av uronsyrer i begge fraksjoner er liten. Den mengden GalA som er i hver fraksjon er dermed i høy grad frie, dermed kan en anta at resultatene fra Metylering og GC/MS er tilstrekkelig gode for å bestemme bindingsforholdene i hver fraksjon.

7.2.7 Molekylvekt-fordeling i HSUR1A og HSUR1B: Separasjon på HiLoad 26/60 Superdex 200 kolonne

HiLoad 26/60 Superdex 200 gelfiltreringskolonne ble brukt til å bestemme molekylvektsområde for HSUR1A og HSUR1B. Det ble satt opp en standardkurve basert på dextranløsninger med kjent molekylvekt som ekstern standard. Følgende dextranmolekyler ble brukt: Dextran T250 (Lot 8374), Dextran B512 (Dex 40 T 8630 Fr 7) og Dextran B512 (Fraction 11640-II-IX). Elueringsvolumet for dextranløsningene ble plottet mot logaritmen til deres gitte molekylvekt. Dette kan en lineær sammenheng (figur 31). Ved hjelp av standardkurven ble molekylvektsområde for polysakkarider i HSUR1A og HSUR1B bestemt. Det er viktig å presisere at molekylvekten ble bestemt i forhold dextranstandardene, og at de gitte verdiene for polysakkaridenes molekylvekt ikke er deres eksakte verdier.

Tabell 12 viser innenfor hvilke volumer hver fraksjon ble eluert ut og molekylvektsintervallet til fraksjonene bestemt ut fra dextranstandardkurven i figur 31. Tabell 13 viser at HSUR1A har et bredt molekylvektsområde som strekker seg fra 5,66-66,60 kDa. Det kan tyde på HSUR1A er en blanding av flere forbindelser. Molekylvektsområde for HSUR1B er betydelig smalere. HSUR1B ligger innenfor 1,69-2,85 kDa. Molekylvektene som er funnet her kan forklare hvorfor begge fraksjoner er veldig lettløselige i vann, løselighet vil avta med en høyere molekylvekt.



Figur 31: Volum (ml) eluert er plottet mot logaritmen molekylvekten (Da) til de ulike dextranstandardene. Dette gir en lineær sammenheng.

FRAKSJON	ELUERINGSINTERVALL (ML)	LOG MW	MW (KDA)	GJENNOMSNITTELIG MW (KDA)
SUR 1A	170,00-260,00	3,75-4,82	5,66-66,60	36,13
SUR 1B	285,00-304,00	3,23-3,45	1,69-2,85	2,27

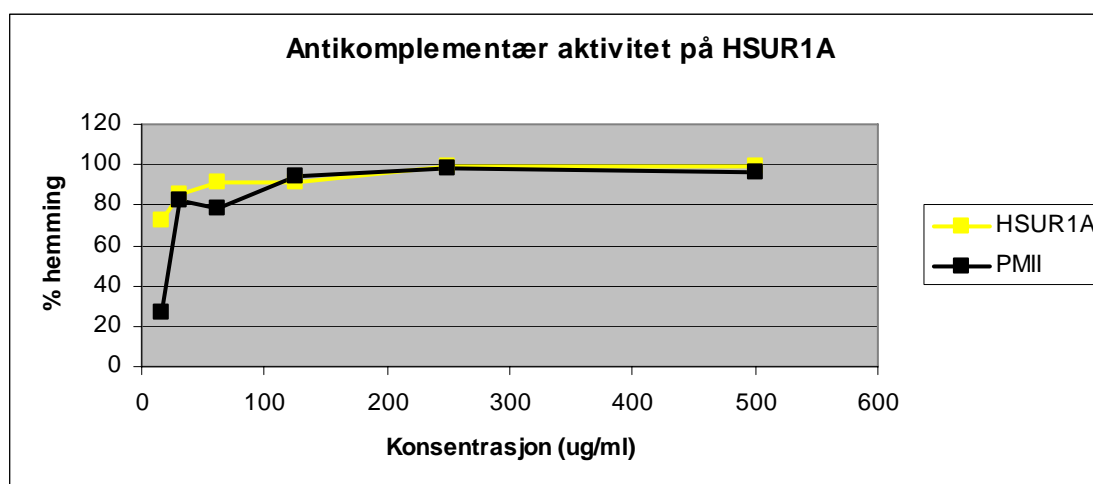
Tabell 12: Område molekylvekten til fraksjon HSUR1A og HSUR1B ligger innenfor

7.3 Måling av biologisk aktivitet av HSUR1A OG HSUR1B

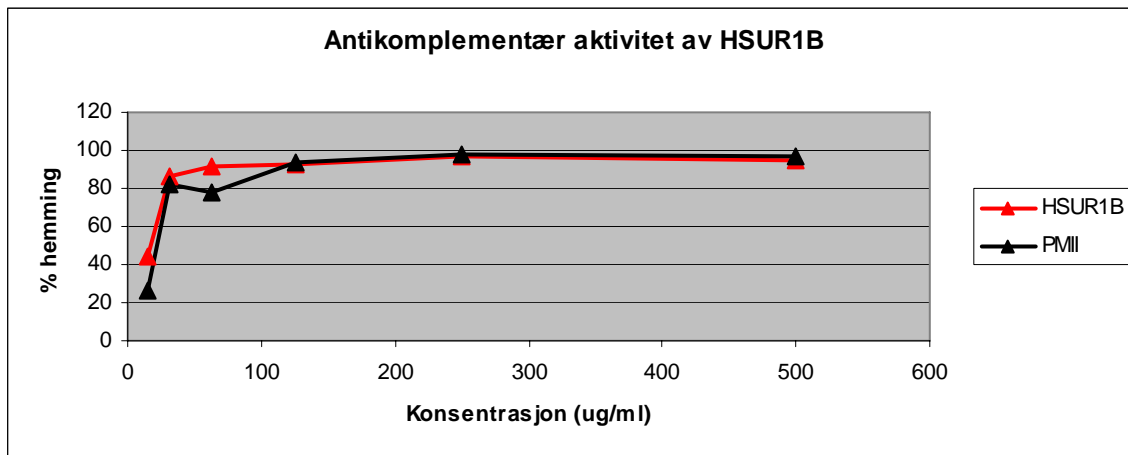
7.3.1 Komplementfikseringstesten

Isolerte pektiner fra *Syzygium guineense* ble studert med hensyn til effekt på komplementsystemet in vitro. Som mål for effekt måles hemolyse inhibisjon av antistoff sensibiliserte saueblodceller. Redusert hemolyse kan bety et forbruk av komplement eller tilbunding av komplement slik at komplement hemmes eller inaktiveres. Det betyr at komplementfikseringstesten kan gi svar på om fraksjonene påvirker komplementsystemet, men ikke på hvilken måte.

PM II, et rensset pektin fraksjon fra groblad (*Plantago major*) brukes som standard i komplementfikseringstesten. Fraksjonenes aktivitet blir uttrykt med en viktig parameter, ICH50. ICH50 er den konsentrasjonen av en prøve som gir 50 % hemolyse. ICH50 ble brukt til å sammenlinke fraksjonene opp mot hverandre og opp mot PM-II. Da dette er et biologisk system vil systemet gi daglige variasjoner, dermed er sammenlikning opp mot PM-II svært viktig. Resultatene vises i figur 32 og 33, der konsentrasjon plottes mot % hemming av antistoff sensibiliserte erytrocyttene fra sau. Høy grad hemming trekker linje mot høy grad hemolyse inhibisjon.



Figur 32: Komplementfikserende aktivitet av PM II og HSUR1A



Figur 33: Komplementfikserende aktivitet av PM II og HSUR1B

Figur 32 og 33 viser at fraksjon HSUR1A og HSUR1B har en tilnærmet lik aktivitet som PMII. ICH50 for HSUR1A er på økt nivå med PM-II, mens ICH50 for HSUR1B er på samme nivå som PMII. For fraksjon HSUR1A er ICH50 ved en konsentrasjon lavere enn 15,6 µg/ml. En lav konsentrasjon som viser til høy prosentvis hemolyse trekker linje mot høypotente pektinpolysakkarider. ICH50 for fraksjon HSUR1B er under 31,3 µg/ml, også dette er en lav konsentrasjon som kan trekke linje mot høypotente pektinpolysakkarider.

PM II har vist å ha aktivitet på både den klassiske og den alternative vei. PM-II viser til pektiner med en hovedkjede bestående av alternerende enheter av galakturonsyre og rhamnose med sidekjeder av arabinogalaktaner, rhamnogalakturonan type I (RG-I). Resultatene fra metylering og GC/MS viser til RG-I strukturer for begge fraksjoner. De ramifiserte områdene i RG-I har blitt isolert og det ble her vist at fraksjonen med lavest molekylvekt har en GalA/Rha ratio større enn fraksjoner med høyere molekylvekt. Dette stemmer overens med funnet for HSUR1A og HSUR1B, der HSUR1A med lavest molekylvekt har en høyere GalA/Rha ratio enn HSUR1B. AG-II strukturer isolert i fra PM-II har vist til aktivitet på komplementsystemet. Disse viser til høy molekylvekt, men en PM II fraksjon har vist aktivitet ved en noe lavere molekylvekt, 46-48 kDa. Fraksjonen har sidekjeder av 1,5 araf og viser til AGP. Disse strukturtrekk er å finne i fraksjon HSUR1B. HSUR1B viser til positiv Yariv test, proteininnhold ved Lowry modifiserte metode, e høyt innhold av 1,5 araf og et molekylvektintervall der 46-48 kDa inngår. Det betyr at fraksjon HSUR1B har mange strukturelle likheter med PM-II, og som figur 33 viser aktiviteten til HSUR1B sammenlinket mot PMII svært lik.

Usikkerhet i resultatene

Aktiviteten måles ved den laveste fortynning av komplement som viser til 50 % hemolyse. For å finne ut av dette ble en kalibreringskurve laget og den fortynningen som viste til 50 % hemolyse ble brukt. I forsøket viste kontroll med buffer/BSA kun til 19 % hemolyse. Lav hemolysegrad skaper usikkerhet i resultatene da lav hemolysegrad kan gi en økt prosentvis hemolyseinhibisjon og dermed

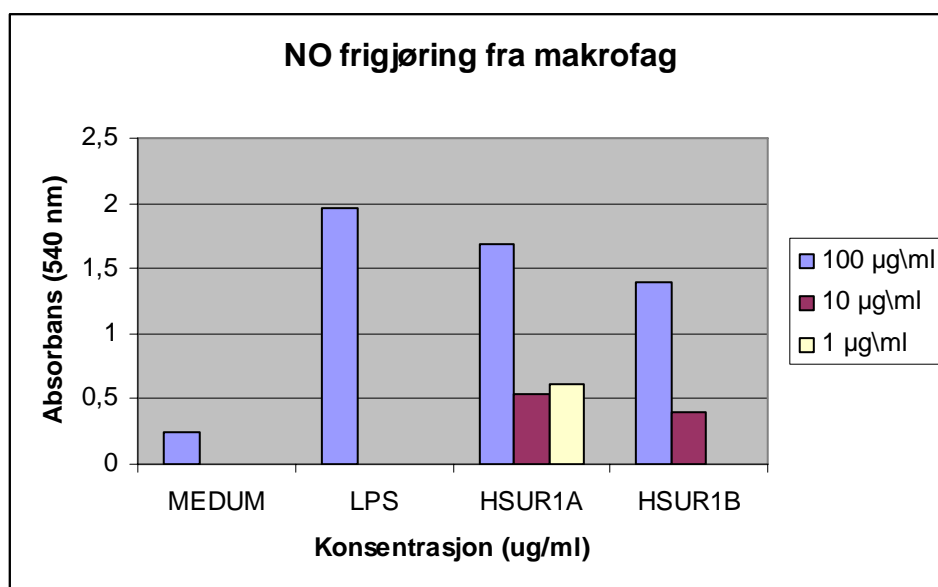
være på økt nivå med det reelle. En potensiell feilkilde for lav absorbans kan forklares med at komplement er svært ustabil. Tilsetning av komplement er et kritisk punkt i testen og komplement må tilsettes raskt slik at det ikke degraderes. På grunn av usikkerheten bak resultatene kan de ikke publiseres, derimot kan en sammenlikne resultatene for HSUR1A og HSUR1B opp mot hverandre og opp mot PM-II.

For fraksjon HSUR1A er ICH50 ved en konsentrasjon lavere enn 15,6 µg/ml. Da det kun ble gjort et forsøk på fraksjonene er ikke ICH50 kjent for HSUR1A, slik at lavere fortynninger må til for å få fraksjonens eksakte ICH50 verdi. Da det kun er gjort et forsøk på fraksjonene skaper dette usikkerhet i resultatene. Da Rusten utførte en komplementfikseringstest Rusten på sine fraksjoner Sg50A1 og Sg50A2 ble ICH50 målt til 18,5 µg /ml, og dette på økt nivå med PM-II. Dette bidrar til å øke troverdighet i resultatet, selv om kun ett forsøk er utført.

7.3.2 Makrofagstimulering

HSUR1A og HSUR1B ble målt for makrofagaktivitet som mål for immunologisk aktivitet.

Makrofager er aktive under både det medfødte og det ervervede immunforsvar og regnes som en av disse viktigste immunceller i vårt immunforsvar. Når en makrofag aktiveres vil de skille ut en del inflammatoriske mediatorer, deriblant NO. NO er ikke stabilt og vil i løsnings raskt nedbrytes til to stabile nedbrytningsprodukter der NO^{2-} er et av de. Som mål for fraksjon HSUR1A og HSUR1B sin evne til aktivere makrofag ble mengde NO^{2-} bestemt ved bruk av Griess reagens system og en standard kurve basert på kjente nitritkonsentrasjoner. Resultatet vises i figur 34.



Figur 34: Måling av NO frigjøring fra makrofag med LPS som positiv kontroll

Resultatene viser at fraksjon HSUR1 har en evne til å aktivere makrofag ved en konsentrasjon 1 µg/ml og at HSUR1B øker makrofagaktivitet ved en konsentrasjon 100 µg/ml. Sammenliknet med positiv kontroll (LPS), viser begge fraksjoner til høy respons, men HSUR1A gir en høyere respons enn HSUR1B. Resultatet samsvarer med resultatet fra komplementfikseringstest, der HSUR1A viste til noe høyere aktivitet enn HSUR1B.

8. Konklusjon

8.1 Etnofarmakologiske studier i Mali

Etnofarmakologiske studier er en vei å gå for å finne det ultimative legemiddelet mot en eller flere sykdommer. *Syzygium guineense* er en godt kjent medisinsplante i de områder i Mali der de optimale vekstbetingelser er tilstedet. Til sammen 30 tradisjonelle healere ble intervjuet på feltarbeid i Mali desember 2007. 23 av 27 healere i områdene rundt Siby brukte *S. guineense* til sammen 22 ulike indikasjoner. Dette feltarbeid alene gir ikke et utvalg som er representativt for kvantitativ analyse, men intervju med tradisjonelle healere er ”kategorisk representativt” for kvalitativ analyse. Resultatet fra dette feltarbeid og sammenliknet med feltarbeid utført i januar/februar 2006 og mars/april 2007 gir gode holdepunkter for at *S. guineense* bør undersøkes for immunologisk aktivitet.

8.2 Prøveopparbeidelse: Isolering og opprensning av polysakkaridfraksjoner

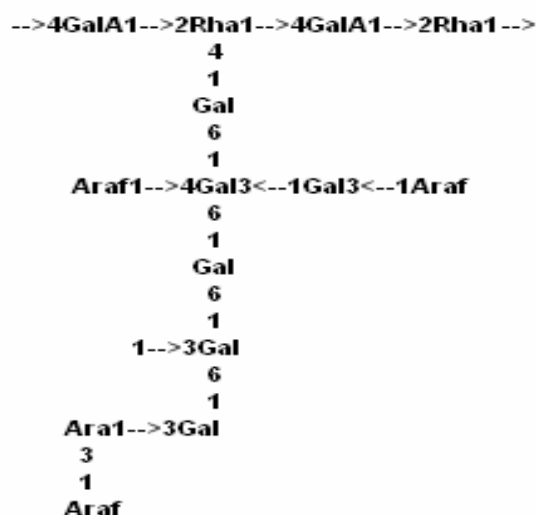
Et 50°C vannekstrakt av blader fra *S. guineense* ble isolert og opprenset på en Bio-Gel® P6-DG kolonne, DEAE- Sepharose Fast Flow ionebytterkolonne og en Sephacryl-S400 gelfiltreringskolonne. Dette gav 2 fraksjoner, HSUR1A og HSUR1B, der HSUR1B har størst molekylvekt. Det foreligger en usikkerhet om den høymolekylære fraksjonen fra Bio-Gel® P6-DG kolonnen burde ha vært fraksjonert annerledes på DEAE- Sepharose Fast Flow ionebytterkolonnen.

8.3 Strukturstudier

Resultatene på karbohydratinnhold og strukturelle trekk på HSUR1A og HSUR1B samsvarer med resultatene Rusten fikk for fraksjonene Sg50A1 og Sg50A2. Trolig har fraksjonene en svært kompleks struktur med mange forgreninger. Fraksjonene viser til pektiner med en hovedkjede bestående av alternerende enheter av galakturonsyre og rhamnose med sidekjeder av arabinaner og arabinogalaktaner, rhamnogalakturonan type I (RG-I). HSUR1B viser til positiv Yariv test og et proteininnhold ved Lowry modifiserte metode, dette kan være innhold av AGII og AGP. Aminosyreanalyse på HSUR1B viser til aminosyrer som inngår i kjerneproteinene i AGP. HSUR1A viser kun spor av AGII ved Yariv test og de ble antatt at den høye forekomsten av Ara og Gal i denne fraksjonen måtte komme fra andre strukturformer enn AG II, resultat fra metylering og

GC/MS støtter ikke denne hypotesen. Molekylvektsområde er svært forskjellig for HSUR1A og HSUR1B, henholdsvis 5,66-66.6 kDa for HSUR1A og 1,69-2,85 kDa for HSUR1B. HSUR1A er mest trolig en heterogen blanding av mange molekylvekter, mens HSUR1B har en mer homogen blanding av molekylvekter. Ingen av uronsyrene var forestret i følge IR- spektroskopi. Begge fraksjoner er svært lettloslig i vann.

Basert på resultat for fraksjon HSUR1B er en modell for hvordan et polysakkarid i denne fraksjonen kan se ut. Den foreslåtte modellen er vist i figur 35.



Figur 35: Foreslått for hvordan et polysakkarid i fraksjon HSUR1B kan se ut

8.4 Immunologisk aktivitet

HSUR1A og HSUR1B viser til tilsvarende aktivitet som PM-II standard i komplementfikseringstesten og begge fraksjoner viser evne til å stimulere vevsmakrofag. I begge tilfeller viser fraksjon HSUR1A til noe høyere aktivitet enn HSUR1B. Dette samsvarer med resultatene. Anders Rusten fikk for sine fraksjoner Sg50A1 og Sg50A2[1]

8.5 Forslag til videre arbeid

Både HSUR1A og HSUR1B kunne vært interessant å arbeide videre med for å finne de eksakte strukturelle trekk av pektin molekylerne som antas å være ansvarlig for den antydde immunologiske aktiviteten. Det kunne også være interessant å undersøke om det er andre høymolekylære forbindelser i bladenes plantecellevegg som er ansvarlig for den antydde immunologiske aktiviteten, som igjen kan forklare plantens tradisjonelle anvendelse.

HSUR1A som trolig er en heterogen blanding av mange molekylvekter bør oppdeles i flere mindre fraksjoner i nye struktur/aktivitetsstudier. Dette foreligger en usikkerhet for om denne fraksjonen har et innhold av AG-II, dette bør undersøkes nærmere for. Enzymatisk degradering av polysakkaridene bør utføres på begge fraksjoner for å få mer informasjon om struktur.

Begge fraksjoner har et stort innhold av Araf, Araf sin betydning for målt immunologisk aktivitet bør undersøkes for. For å få nærmere strukturinformasjon om hvordan Araf er bundet i fraksjonene kan dette bestemmes ved å sammenlikne metylering og GC/MS resultat før og etter svak syrehydrolyse. En reduksjon i forgrenede monosakkaridenheter kan gi en indikasjon på at Ara er bundet til disse.

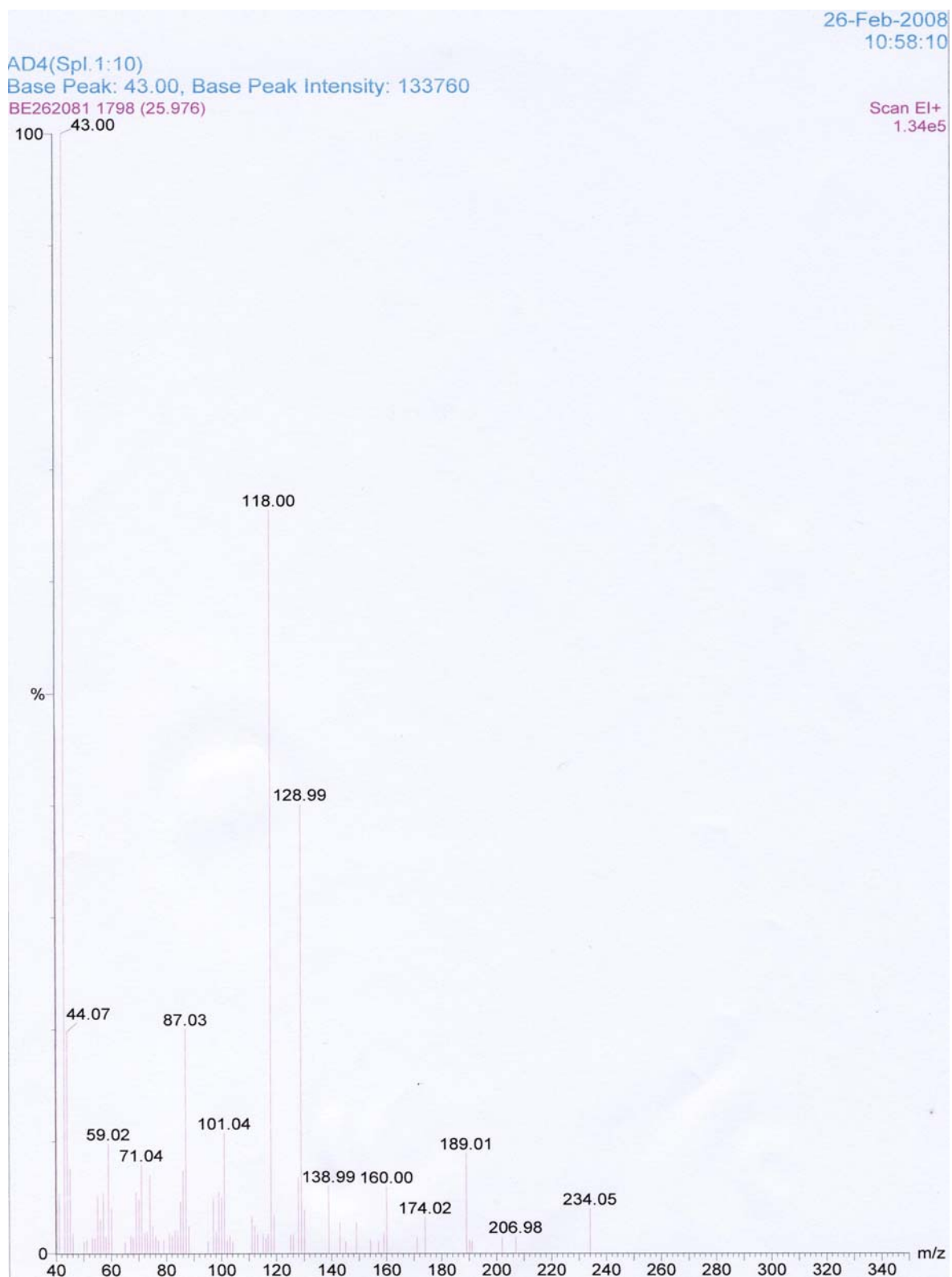
Kun en test ble utført på komplementfikserende aktivitet, det er høy usikkerhet i resultatene. Flere tester bør utføres. En fortynningsrekke som inkluderer lavere konsentrasjoner bør forsøkes for å finne den eksakte IC_{50} for HSUR1A.

Begge fraksjoner viser til immunologisk aktivitet in vitro. In vitro forsøk gir bare en indikasjon på om forbindelsene har effekt in vivo. Det er nødvendig med ytterligere undersøkelser både in vitro, og videre in vivo med tanke effekt og toksisitet og potensiell kommersiell verdi.

9. Vedlegg

Kjemikaler

Agarose	Biorad
Ammoniakk (NH ₃)	Merck
Arabisk gummi	Avdeling for farmakognosi
Destillert vann	Farmasøytisk institutt
Diklormetan (DCM)	Fluka
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck
Edikksyre	Prolabo
Eddiksyreanhydrid	Merck
Fenol	Merck
Folin fenolreagens	Merck
Fosforsyre	Merck
Heksametyldisilazan (HMDS)	Aldrich
Imidazol	Fluka
Kloroform	Prolabo
Kobber(II)sulfat-5-hydrat	Merck
MES (2-(N-Morfolino) etan sulfonsyre)	Merck
Mannitol	SIGMA
Metanol (MeOH)	Merck
1-Metylimidazol	Fluka
Metyljodid (CH ₃)	Fluka
Natriumazid (NaN ₃)	Merck
Natrium borodeuterid	Sigma Aldrich
Natrium borohydrid	Sigma Aldrich
Natriumklorid (NaCl)	AnalaR [®]
Natriumkarbonat (NaCO ₃)	Merck
Natriumdikarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Natrium deoksykolat	AnalaR [®]
Natrium hydroksid	AnalaR [®]
Natriumthiosulfat 5-hydrat	Merck
N-cyclohexyl-N-(2-morpholinoetyl)	Aldrich
N-(1-naptyl)etylenediamine	Merck
Oksalsyre dihydrat	Merck
Oktanol	Merck
Pyridin	Merck
Saltsyre	Merck
Svovelsyre	Merck
Sølvnitrat (AgNO ₃)	Merck
Tolulen	Prolabo
Trikloredikksyre	Supelco
Trimetylklorsilan	Merck
Tri-natriumcitrat-2-hydrat	Merck
Trisma (Tris(hydroksymetyl)aminometan)	Sigma
Yariv-antigen	Avdeling for farmakognosi



Fraksjoner av 3,4,6 Gal: 234, 189, 118

10. Referanser

1. Rusten, A., Struktur og aktivitetsstudier av polysakkarider fra Syzygium guineense. Etnofarmakologiske studier i Mali. Hovedfagsoppgave, 2006, Oslo, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
2. Wursten, B., Flora of Zimbabwe, <http://www.zimbabweflora.co.zw>, 2005, aksessert 21.01-2008
3. AgroForestrytree Database, <http://www.worldagroforestrycentre.org> , aksessert 20.01.2008
4. IT IS- Integrated Taxonomic Information System, www.itis.usda.gov, aksessert 11.11.2007
5. Burkhill, H., Syzygium guineense (Willd.)DC. I: The Useful Plants of West Tropical Africa. The Trustees of Royal Botanic Gardens: Kew, 1997. **4**: s 253-255
6. Hamil, F.A., Apio, N.K., Mubiru, M., Mosango, R., Bukenya-Ziraba, O.W., Maganyi., Soejarto, D.D., Traditional herbal drugs of southern Uganda. I: Journal of Ethnopharmacology, 2000. **70**: s. 281–300.
7. Amusan, O.O.G., Dlamini, P.S., Msonthi, J.D., Makhubu, L.P., Some herbal remedies from Manzini region of Swaziland. I: Journal of Ethnopharmacology, 2002. **79**: s.109–112.
8. Djoukeng, J.D., Abou-Mansour, E., Tabacchi, R., Tapondjou, A.L., Bouda, H., Lontsi, D., Antibacterial triterpenes from Syzygium guineense (Myrtaceae). I: Journal of ethnopharmacology, 2005. **101(1-3)**: s. 283-286
9. Alberts, B.J. A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., The plant cell wall. I: The Cell. Garland Science, New York, 2007. s.1120-1124
10. Koning, R.E., Basic Plant Cytology 1. I: Plant Physiology Information Website. http://149.152.32.5/Plant_Physiology/basiccytology1.html, 1994, aksessert 28.04.2008
11. Cui, S.W., Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. I: Food Carbohydrates. Taylor & Francis, New York, 2005. s. 1-63
12. Cui, S.W., Monosaccharide analysis. I: Food Carbohydrates, Taylor & Francis, New York 2005. s. 74-79
13. McMurry, J., Biomolecules: Carbohydrates. I: Organic chemistry, Brooks/cole, Pacific Grove, 1999. **5**: s.1031-1062.
14. O'Neill, M., Albersheim, P., Darvill, A., The pectic polysaccharides of primary cell walls. I: Methods in plant biochemistry. Dey, P.M., Harbourne, J.B (eds). Academic Press, 1990. **2**: s 415-441.

15. Paulsen, B., Barsett, H., Bioactive Pectic Polysaccharides. I: Advances in polymer science, 2005. **186**: s.69-101.
16. Pilnik, W., Vorgan, G., Pectic substances and other Uronides. I: The Biochemistry of Fruits and their Products. Hulme, A.G(ed). Academic Press, London, 1970. s 53-87.
17. Hildebrand, D., Carbohydrate Metabolism -Fructans, Cell Wall Polysaccharides, Gums. <http://www.uky.edu/~dhild/biochem/11B/lect11B.html>, 2007, aksessert 25.4.2008.
18. The Complex Carbohydrate Research Center of The University of Georgia, Pectic Polysaccharides. I: Monoclonal Antibodies for Plant Cell Walls, <http://www.ccrcc.uga.edu/~mao/wallmab/Pectin/pectin.htm>, aksessert 25.4.2008.
19. Pérez, S., Rodríguez-Carvajala, M.A., Docob, T., A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. I: Biochimie, 2003. **85(1-2)**: s109-121.
20. Showalter, A.M., Arabinogalactan-proteins. Structure, expression and function. I: CMLS cellular and molecular life sciences. Birkhauser, Basel, 2001. **58**: s.1399-141.
21. Parham, P., The Immune system, 2.utgave.Garland Science, New York, 2005.
22. Yamada, H., Kiyohara, H., Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. I: Immunomodulatory Agents from Plants. Wagner, H (ed).Birkhauser, Basel, 1999. s 161-202
23. Alberts, B.J. A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Complement Activation Targets Pathogens for Phagocytosis. I: The Cell. Garland Science, New York, 2007. s.1457 .
24. Yamada, H., Kiyohara, H., Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. I: Immunomodulatory Agents from Plants. Wagner, H (ed).Birkhauser, Basel, 1999. s 161-202
25. Iwu, M.M., Ethnobotanical approach to pharmaceutical drug discovery: strength and limitations. I: Ethnomedicine and drug discovery. Iwu og Wootton (Eds).Elsevier science, 2002.s.309-321.
26. Nelson-Harrison, S.T. et al., Ethnobotanical research into the 21st century. I: Ethnomedicine and drug discovery. Iwu og Wootton (Eds).Elsevier science, 2002.s.283-307.
27. Soejarto, D.D.et.al., Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property rights and benefit-sharing. I: Journal of ethnopharmacology, 2005.**100**: s. 15-22.
28. Fenwick, S., Bioprospecting or biopiracy. I: DDT.Elsevier science, 1998. **3(9)**: s 399-402

29. Wursten, B., Mali. I: CIA World factbook.
<https://www.cia.gov/redirects/ciaredirect.html>, 2007, aksessert 15/11-2007.
30. Diallo, D., Paulsen, B.S., Pharmaceutical research and traditional practitioners in Mali: Experiences with benefit sharing. I: Svarstad H, Dhillon SS. Bioprospecting. From biodiversity in the South to medicines in the North. Spartacus forlag, Oslo, 2000. s. 133 - 44.
31. Diallo, D., Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada Africana* (mimosaceae), *Trichilia emetica* (meliaceae). Doktorgradsoppgave, 2000, Université de Lausanne.
32. Austarheim, I., Biologisk aktive polysakkarider fra *Glinus oppositifolius* (L.) AUG. DC. Hovedfagsoppgave, 2007, Oslo, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
33. Samuelsson, G., Freeze-drying. I: Drugs of natural origin, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 1999. **4**: s.37
34. Rasmussen, K. E. og Pedersen-Bjergaard, S., Væske-væske ekstraksjon (LLE). I: Legemiddelanalyse, Fagbokforlaget Vigmodstad & Bjørke AS, Bergen 2004, s.275-284.
35. Pierce Biotechnology, High-Performance Dialysis and Desalting. I: Instruksjonsmanual. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/PIERCE_DialysisBrochure.pdf0029, 2006. s.1-3.
36. AmershamBiosciences., Gelfiltration in theory. I: Gel Filtration Principles and methods, 2002. s.73-80
37. Bio-Rad Laboratories, Bio-Gel P Polyacrylamid Gel. I: Instruction Manual, Hercules, CA.
38. AmershamBiosciences., Sephacryl: fast, high recovery separations at laboratory and industrial scale. I: Gel Filtration Principles and methods, 2002. s.45-51.
39. AmershamBiosciences., Superdex: first choice for high resolution, short run times and high recovery. I: Gel Filtration Principles and methods, 2002. s 35-44
40. Greibrokk, T., Ionebytterkromatografi. I: Kromatografi. Greibrokk, Karlsen og Rasmussen (Eds). Universitetsforlaget, 1987.**2**: s 69-93
41. AmershamBiosciences., DEAE Sepharose Fast Flow. I: Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing, Principles and Methods, 2004. S.1-188.
42. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S., Lee, Y.C., Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. I: Analytical biochemistry, 2005.**339**: s.69-72
43. Solomon, G., Fryhle, C., A mechanism for the Sn1 reaction. I: organic chemistry. John Wiley and Sons, New York, 2002. **7**: s 244-250
44. Cui, S.W., Monosaccharide analysis. I Food Carbohydrates, Taylor & Francis, New York 2005,s. 74-79

-
45. Rasmussen, K. E. og Pedersen-Bjergaard, S., Gasskromatografi. I: Legemiddelanalyse, Fagbokforlaget Vigmodstad & Bjørke AS, Bergen 2004, s.193-211.
 46. Cui, S.W., Methylation analysis. I: Food Carbohydrates. Taylor & Francis, New York, 2005. s. 108-114
 47. Price, N.P.J., Permethylation Linkage Analysis Techniques for Residual Carbohydrates. I: Applied Biochemistry and Biotechnology. Humana Press Inc, 2007. **148 (1-3)**: s.271-276
 48. McMurry, J., The S_N2 Reaction. I: Organic chemistry. Brooks/Cole, Pacific Grove, 1999. **5**: s.1031-1062.
 49. Kim, J.B., Carpita, N.C., Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles. I: Plant Physiology, 1992. **98**: s 646-653.
 50. Samuelsen, A.B., Partial hydrolysis. I: Polysaccharides in *Plantago major* L. Studies of Structure and Biological Activity, Thesis for the degree Doctor Scientiarum, 1998, Oslo, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, s.58-59.
 51. Nothnagel, E.A., Lyon, J.L., Structural Requirements for the Binding of Phenylglycosides to the Surface of Protoplast. I: Plant physiology, 1986. **80**: s. 91-98
 52. Rasmussen, K. E., Pedersen-Bjergaard, S., IR-spektroskopi. I: Legemiddelanalyse, I: Fagbokforlaget Vigmodstad & Bjørke AS, Bergen, 2004, s.109-118.
 53. Lowry, O.H., Roserbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent. I: The journal of biological chemistry, 1951.s 265-274.
 54. Peterson, G.L., Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. I: Analytical Biochemistry, Winconsin, 1979.**100**: s.201-220
 55. Michaelsen, T.E., Gilje, A., Samuelsen, A.B., Hogasen, K., Paulsen, B.S., Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. I: Scandinavia Journal of Immunology, 2000.**52(5)**: s. 483-490.
 56. Promega Corporation., Griess reagent system. I: Instruction manual for use of product G2930, Madison, 2005. s. 1-8